

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA

**“IDENTIFICACIÓN DE BIOMARCADORES
DIAGNÓSTICOS Y TERAPÉUTICOS DE
ANEURISMAS DE AORTA ABDOMINAL
MEDIANTE NUEVAS APROXIMACIONES
PROTEÓMICAS”**

TESIS DOCTORAL

PRISCILA RAMOS MOZO

Madrid, 2012

DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA

FACULTAD DE MEDICINA

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

**“IDENTIFICACIÓN DE BIOMARCADORES
DIAGNÓSTICOS Y TERAPÉUTICOS DE
ANEURISMAS DE AORTA ABDOMINAL
MEDIANTE NUEVAS APROXIMACIONES
PROTEÓMICAS”**

TESIS DOCTORAL

PRISCILA RAMOS MOZO

LICENCIADA EN BIOLOGÍA

DIRECTORES DE TESIS: JOSÉ LUIS MARTÍN VENTURA Y JESÚS EGIDO DE LOS RÍOS

LABORATORIO DE NEFROLOGÍA EXPERIMENTAL Y PATOLOGÍA VASCULAR

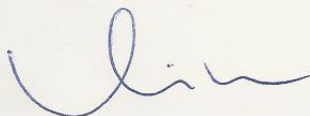
FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ

Don Jesús Egido de los Ríos, Catedrático de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid, y
Don José Luis Martín Ventura, Doctor en Bioquímica por la Universidad Autónoma de Madrid,

CERTIFICAN

Que Doña Priscila Ramos Mozo, Licenciada en Biología por la Universidad Complutense de Madrid, ha realizado en el Laboratorio de Nefrología Experimental y Patología Vascular de la Fundación Jiménez Díaz, bajo su dirección, la presente Tesis Doctoral con título "Identificación de Biomarcadores diagnósticos y terapéuticos de Aneurismas de Aorta Abdominal mediante nuevas aproximaciones proteómicas".

Y para que conste, firmamos la presente en Madrid, a 10 de septiembre del 2012.



Dr. Jesús Egido de los Ríos



Dr. José Luis Martín Ventura



Tutor: Dra. Concepción Peiró Vallejo

AGRADECIMIENTOS

Quisiera mostrar en estas líneas mi agradecimiento a todas las personas e instituciones que han hecho posible la realización de esta Tesis Doctoral, comenzando por la Unuversidad Autónoma de Madrid y mis directores de Tesis, el Dr. Jesús Egido de los Ríos y el Dr. José Luis Martín Ventura y a mis compañeros, por su inestimable apoyo y la gran cantidad de tiempo dedicado a este trabajo.

También tengo que dar las gracias al Dr. Juan Antonio López, al Dr. Emilio Camafeita y al Dr. Enrique Calvo de la Unidad de Proteómica del CNIC, por proporcionarme una buena base de las técnicas proteómicas.

Agradecer también el afecto recibido por todos los grandes amigos sin cuyo aliento nunca habría llegado hasta aquí. Algunos de ellos están en la FJD, o han pasado por aquí en algún momento y han aportado su granito de arena para hacer del lugar de trabajo un sitio más entrañable. Otros, más antiguos, con su cariño desde la distancia, que siempre están allí cuando los necesito. Gracias por tantas cosas que aquí no caben...

A mi familia, que son el pilar fundamental en que se asientan las bases de esta Tesis. Y, sobre todo, a mis padres por vuestro apoyo incondicional y vuestra fe en mí a lo largo de toda mi vida.

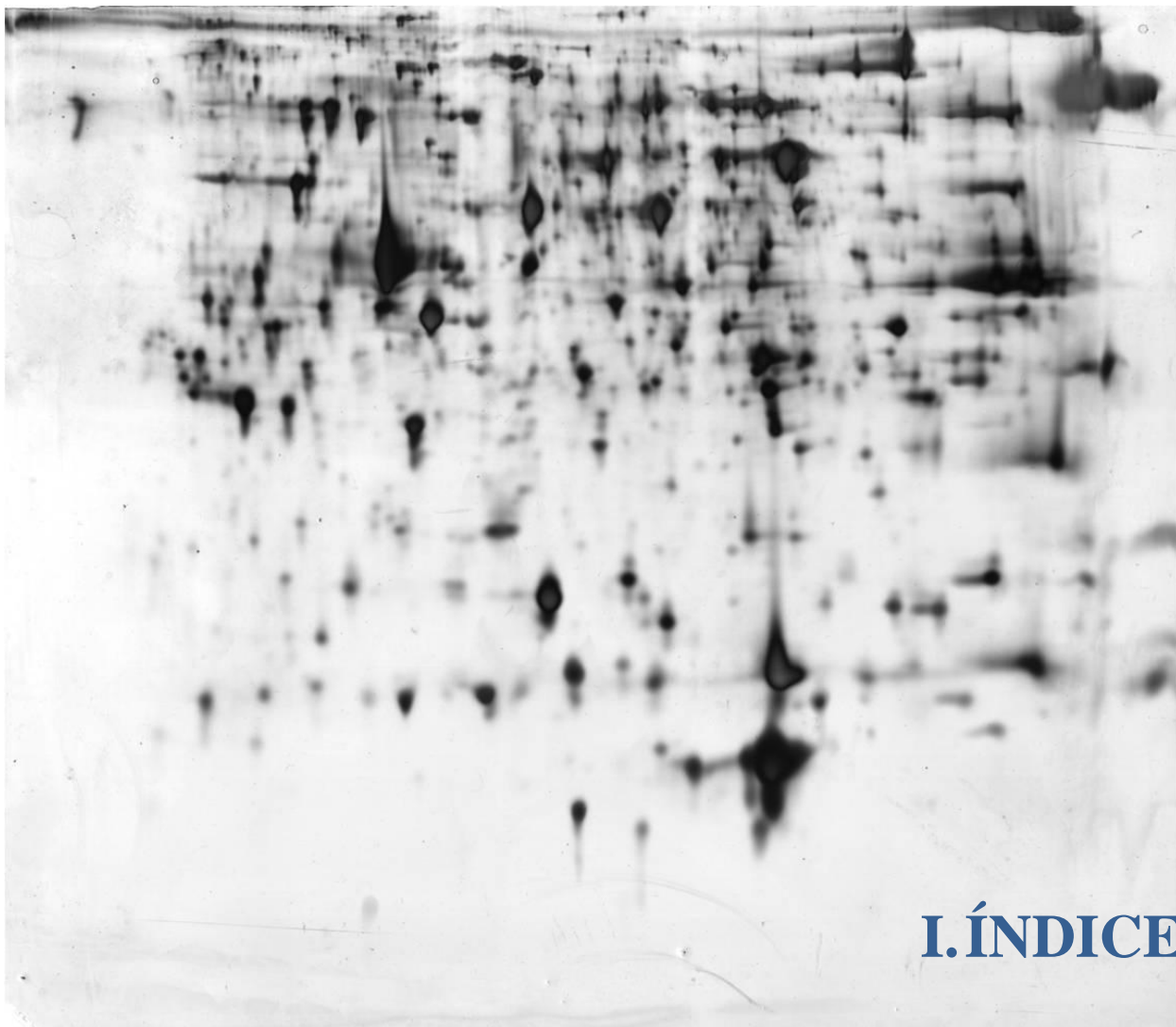
Por último, a David has sido tú quien ha estado ahí, día tras día, dándome las fuerzas para seguir adelante, especialmente en los momentos más difíciles. Gracias por ser la inspiración y la fuerza que me han mantenido en pie todos estos años.

Resumen:

El Aneurisma de Aorta Abdominal (AAA) es una enfermedad generalmente asintomática, cuyo diagnóstico suele ser casual y que no tiene un tratamiento específico excepto cirugía cuando tiene un tamaño superior a 5cm para evitar su rotura. El objetivo principal de esta tesis fue el estudio de biomarcadores diagnósticos y/o terapéuticos mediante técnicas de alto rendimiento como la proteómica. En una primera parte, abordamos el estudio en el plasma deplecionado de proteínas mayoritarias mediante geles 2D-DIGE observando un aumento de RBP-4 en pacientes con AAA de pequeño diámetro, posiblemente asociado a procesos inflamatorios y/o a la presencia de síndrome metabólico. Como la depleción de proteínas puede llevar asociada la eliminación de proteínas minoritarias como las citoquinas, analizamos el plasma mediante un array de citoquinas, identificando niveles elevados de IGFBP-1 en pacientes con AAA. Sin embargo, a nivel tisular observamos retención y proteólisis de IGFBP-1 en el trombo intraluminal (ILT) que puede favorecer la agregación plaquetaria mediada por IGF-1. Posteriormente realizamos el estudio de los subproteomas de células circulantes (plaquetas y neutrófilos) implicadas en la formación y desarrollo del ILT. El análisis de las plaquetas por geles 2D-DIGE demostró una disminución de ApoA1 en pacientes con AAA, posiblemente asociado a la disminución de ApoA1 en plasma y a su posible proteólisis vascular. El estudio de neutrófilos identificó nuevos biomarcadores como la catalasa, cuya disminución tanto en neutrófilos como en eritrocitos de pacientes con AAA refuerza la importancia del estrés oxidativo en la evolución de la enfermedad. Así mismo, también identificamos ciclofilina A, una proteína que es secretada principalmente por células de músculo liso vascular y cuya función extracelular está relacionada también con el control del balance redox celular. Finalmente, describimos NGAL como un biomarcador de activación de neutrófilos y analizamos su implicación en los procesos inmuno-inflamatorios y de remodelado vascular en un modelo experimental de AAA. Estos nuevos biomarcadores podrían ayudar tanto en el diagnóstico de la enfermedad, así como para la aplicación de nuevas terapias.

Summary:

Abdominal Aortic Aneurysms (AAA) is usually an asymptomatic disease, whose diagnosis is casual and does not have specific treatment, except surgery when the aneurisms are larger than 5cm. Our main aim in this study is the search of diagnostic and / or therapeutic biomarkers in AAA by proteomic techniques. In the first part, we studied the depleted plasma using 2D-DIGE, showing increased levels of RBP-4 in patients with small aneurisms, likely associated with inflammatory processes and/or metabolic syndrome. As the depletion of proteins in the plasma could eliminate others minority proteins, we analyzed the plasma using proteins arrays and we identified an increase of IGFBP-1 in the patients' plasma. However we observed proteolysis of IGFBP-1 in the intraluminal thrombus (ILT) that could favor platelet aggregation mediated by IGF-1. We also studied the subproteomes of circulating cells (neutrophils and platelets) as these cells are involved in the formation and development of ILT. The proteomic analysis of platelets show decrease levels of Apo A1 in patients possibly associated with the decrease levels of this protein in the patients' plasma and the vascular proteolysis of Apo A1. In the study of neutrophils we identified new biomarkers as catalase, which is decreased on neutrophils and also erythrocytes of patients, suggesting that oxidative stress is important in AAA evolution. We also identified CypA, a protein secreted by vascular smooth muscle cells that regulate the redox balance in the extracellular compartment. Finally we described NGAL as a new biomarker of neutrophil activation and we analyzed the function of NGAL in the immune-inflammatory processes in an experimental model. These new biomarkers could help in the diagnosis of AAA as well as in the application of the new therapies.



I.ÍNDICE

I. ÍNDICE	1
Abreviaturas	5
II. INTRODUCCIÓN	8
1. Aneurisma	9
2. Aneurisma de aorta abdominal	10
2.1. Etiología del Aneurisma de aorta abdominal: implicación celular y mecanismos moleculares asociados.	11
2.2. Formación e importancia del trombo intraluminal	12
2.2.1. Leucocitos polimorfonucleares	13
2.2.2. Plaquetas	14
2.2.3. Eritrocitos	15
3. Biomarcadores	15
4. Proteómica	17
4.1. Métodos de separación de proteínas	18
4.1.1. Electroforesis bidimensional y tecnología 2D- DIGE	18
4.1.2. Espectrometría de masas	20
4.1.2.1. MALDI-TOF	21
5. Técnicas complementarias a la proteómica: columnas cromatográficas	22
6. Otras técnicas proteómicas	24
III. OBJETIVOS	25
IV. MÉTODOS Y RESULTADOS	27
1. Análisis proteómico del plasma mediante 2D-DIGE	27
1.1. Materiales y Métodos	27
1.1.1. Deplección del Plasma	27

1.1.2.	Electroforesis 2D-DIGE	27
1.1.3.	Identificación de proteínas por MALDI-TOF/TOF	29
1.1.4.	Western Blot	29
1.1.5.	ELISA	29
1.1.6.	Inmunohistoquímica	30
1.2.	Resultados	30
1.2.1.	Análisis DIGE de muestras de plasma de pacientes con AAA	30
1.2.2.	ELISA de RBP-4 en el plasma de pacientes con AAA	31
1.2.3.	Western Blot de RBP-4 en sobrenadantes del ILT	31
1.2.4.	Inmunohistoquímica de RBP-4 en el ILT	31
2.	Estudio de proteínas en plasma mediante array, identifica IGFBP-1 como nuevo marcador biológico del aneurisma de aorta abdominal	36
3.	Análisis proteómico de plaquetas mediante 2D-DIGE	44
3.1.	Materiales y Métodos	44
3.1.1.	Aislamiento de plaquetas	44
3.1.2.	Aislamiento de plasma	44
3.1.3.	2D-DIGE	44
3.1.4.	Identificación de proteínas por MALDI-TOF/TOF	45
3.1.5.	Western Blot	45
3.1.6.	Inmunohistoquímica	46
3.1.7.	Determinación de la Apo A1 en plasma	46
3.2.	Resultados	47
3.2.1.	Western Blot de P-selectina en plaquetas de pacientes con AAA	47

3.2.2.	2D-DIGE en plaquetas de pacientes AAA	48
3.2.3.	Western blot de Apo A1 en plaquetas y en sobrenadantes del ILT	50
3.2.4.	Inmunohistoquímica de Apo A1 en el ILT	51
3.2.5.	Determinación de la Apo A1 en plasma	52
4.	El análisis proteómico de neutrófilos, identifica la catalasa como nuevo biomarcador de aneurisma aórtico abdominal: Posible implicación del estrés oxidativo en la progresión de aneurisma aórtico abdominal	57
5.	Estudio del estrés oxidativo en eritrocitos de pacientes con AAA	74
5.1.	Materiales y Métodos	74
5.1.1.	Aislamiento de la membrana de eritrocitos	74
5.1.2.	Western Blot	74
5.2.	Resultados	75
5.2.1.	Western Blot de catalasa y Prdx-2 en eritrocitos de pacientes con AAA	75
6.	Función de la Ciclofilina A en el aneurisma de aorta abdominal	76
7.	Incremento de los niveles plasmáticos de NGAL, un marcador de activación de neutrófilos, en pacientes con aneurisma de aorta abdominal	91
8.	Modelo de ratones knockout para NGAL	97
8.1.	Materiales y Métodos	97
8.1.1.	Inyección de elastasa en ratones Knockout para NGAL y en ratones WT	97
8.1.2.	Tinción masson	98
8.2.	Resultados	98
V.	DISCUSIÓN	99
1.	Plasma	99

1.1. Función del RBP-4 en el AAA	99
1.2. IGFBP-1 posible nuevo marcador del AAA	100
2. Células circulantes	102
2.1. Implicación de las plaquetas en la formación y desarrollo del ILT	103
2.2. Análisis proteómico de PMNs: catalasa posible biomarcador de AAA	105
2.3. Función de la CypA en el AAA	107
2.4. NGAL marcador de activación de neutrófilos en pacientes con AAA	109
V.I. CONCLUSIONES	113
V.I.I. BIBLIOGRAFÍA	115
V.I.I.I. ANEXOS	133

ABREVIATURAS

Relación de abreviaturas que aparecen en el texto. En muchos casos se ha conservado la correspondiente abreviatura en inglés debido a su frecuente utilización en el lenguaje científico.

AAA: Aneurisma de Aorta Abdominal

AAT: Alfa 1 antitripsina

Apo A1: Apolipoproteína A1

Cf-DNA: DNA liberado

CMLV: Células de músculo liso vascular

CypA: Ciclofilina A

DD: D- dímeros

2-DE: Electroforesis bidimensional

2D- PAGE: Electroforesis bidimensional en geles de poliacrilamida

Grp 94: Proteína reguladora de glucosa 94

GSTO-1: Glutación transferasa omega 1

HDL: Lipoproteína de alta densidad

HPLC: Cromatografía líquida de alta resolución

H₂O₂: Peróxido de hidrógeno

IEF: Isoelectroenfoque

IFN γ : Interferón gamma

IGF-1: Factor de crecimiento ligado a insulina 1

IGFBP-1: Proteína de unión a IGF-1

IgG: Inmunoglobulina G

IL-1b: Interleuquina 1b

IL-6: Interleuquina 6

ILT: Trombo intraluminal

IPG: Gradientes de pH inmovilizados

IRC: Insuficiencia renal crónica

LDL: Lipoproteína de baja densidad

MALDI: Desorción/ionización con laser asistido por matriz

MMP-9: Metaloproteinasa 9

MMPs: Metaloproteinasas

MPO: Mieloperoxidasa

MS: Espectrometría de masas

NGAL: Lipocalina de neutrófilos asociada a gelatinasa

NGAL^{-/-}: ratones *knockout* para NGAL

NO: Óxido nítrico

PAP: Complejo plasmina antiplasmina

PCR: Proteína C reactiva

pI: punto isoeléctrico

PMA: Fosfato miristato acetato

PMNs: Polimorfonucleares

Prdx: Peroxirredoxina

Prdx-1: Peroxirredoxina 1

Prdx-2: Peroxirredoxina 2

PRP: Plasma rico en plaquetas

RBP-4: Proteína de unión al retinol 4

ROS: Especies reactivas de oxígeno

Rpm: Revoluciones por minuto

SOD: superóxido dismutasa

TNF α : Factor de necrosis tumoral alfa

TOF: Tiempo de vuelo

TRX: Tioredoxina

WT: Fenotipo salvaje



1. Aneurisma.

Un aneurisma es la dilatación localizada e irreversible de una arteria producida por la alteración de la integridad de su pared. Existen varias clasificaciones de los aneurismas, los aneurismas fusiformes son dilataciones circunferenciales, mientras que los saculares consisten en evaginaciones de un solo "lado" de la pared de la arteria. Los falsos aneurismas o pseudoaneurismas consisten en una separación entre las capas de la arteria, se podría comparar a una burbuja localizada entre capas. Los aneurismas disecantes se producen por la existencia de un desgarró en la íntima y en la media, este desgarró puede deberse a traumatismos, pero lo habitual es que su origen no se conozca.

Cada vaso arterial está formado por tres capas concéntricas (Figura 1):

-Interna o íntima: constituida por el endotelio, una lámina basal y una capa conjuntiva subendotelial.

-Media: es una capa de aspecto compacto y de espesor regular, compuesta por fibras musculares lisas dispuestas de forma concéntrica, fibras elásticas y fibras de colágeno.

-Externa o adventicia: formada por tejido conjuntivo laxo, compuesto fundamentalmente por fibroblastos y colágeno.

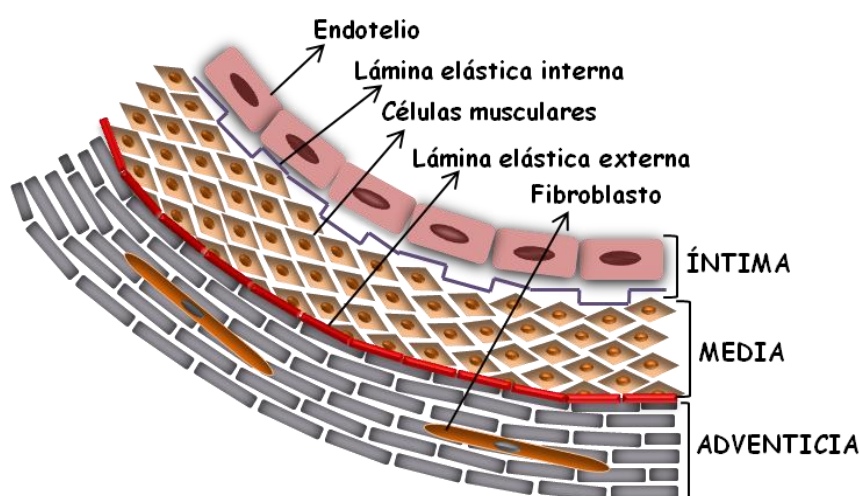


Figura 1: Histología de la pared arterial.

Existe una relación entre la patología de la aterosclerosis y los aneurismas, pero se diferencian en que las lesiones ateroscleróticas se dan predominantemente en la íntima (lesiones oclusivas) mientras que la media y la adventicia están principalmente involucradas en los aneurismas (lesiones dilatantes). De los diferentes tipos de aneurisma que hay el de aorta abdominal es el que se desarrolla más frecuentemente.

2. Aneurisma de aorta abdominal.

El aneurisma de aorta abdominal (AAA) es un ensanchamiento permanente de la aorta en la zona abdominal debido a un daño en la pared. Se considera aneurisma cuando el ensanchamiento de la aorta es superior a 3 cm de diámetro (Lindholt, J.S., 1998), actualmente algunos autores consideran que hay aneurisma cuando la dilatación de la aorta es mayor al 50% del diámetro normal de la aorta. Cuando este diámetro alcanza un tamaño igual o superior a 5 cm existe una mayor posibilidad de rotura y por eso los pacientes son sometidos a cirugía abierta o endovascular (Figura 2).

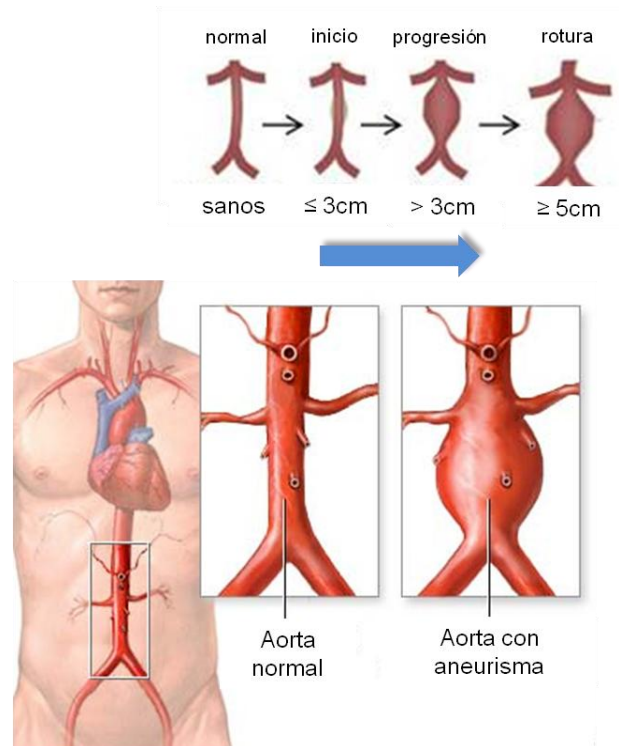


Figura 2: Aneurisma aórtico abdominal. Inicio y progresión del aneurisma.

El AAA ha sido reconocido como un importante problema de salud en la última década. Como se ha registrado en la mayoría de los estudios encontrados en la literatura científica, se prevé que su incidencia posiblemente aumente en los próximos años debido fundamentalmente al aumento en la expectativa de vida de la población.

Estudios poblacionales demuestran que entre un 3-8% de los varones mayores de 65 años tienen aneurisma. En mujeres la probabilidad de desarrollar aneurisma es menor, pero presentan una mayor mortalidad que en varones (Hultgren, R., 2007). El desarrollo de AAA y la rotura del aneurisma no presentan una correlación lineal y generalmente aparecen otros factores que aceleran este proceso (Kurvers, H., 2004). La dilatación del aneurisma puede permanecer estable y asintomática durante muchos años, en los cuales los pacientes pueden morir por otras causas (Powell, J.T., 1998).

2.1. Etiología del Aneurisma de aorta abdominal: Implicación celular y mecanismos moleculares asociados con AAA.

La etiología del AAA es multifactorial con complejas interacciones entre factores ambientales y factores genéticos. El AAA presenta una mezcla de factores de riesgo vascular como: la edad, tabaco, hipertensión, hipercolesterolemia y factores genéticos (Urbonavicius, S., 2010). El tabaco es el mayor factor de riesgo de AAA probablemente debido a la capacidad que tiene para inhibir α -1-antitripsina (AAT), que a su vez es un inhibidor de elastasa (Lindholt, J.S., 2003). En relación a los lípidos, la hipercolesterolemia está relacionada con el desarrollo del aneurisma, pero el factor más asociado con la presencia de AAA es la baja concentración de colesterol asociado a lipoproteínas de alta densidad (HDL, *High density lipoproteins*) (Ortiz-Muñoz, G., 2009)(Forsdahl, S.H., 2009).

No hay establecido un tratamiento para los AAA pequeños (diámetro del aneurisma entre 3-5cm), que ocasionalmente se pueden romper (Urbonavicius, S., 2008). Si pudiéramos saber aquellos AAA pequeños que requieren una intervención más temprana, quizás se podrían tratar con antelación disminuyendo la morbilidad y la mortalidad ya que la edad también es un factor de riesgo. Así podríamos evitar roturas del AAA durante la progresión de la enfermedad (Cornuz, J., 2004).

En este sentido, los principales mecanismos asociados a la formación de los AAA son la proteólisis y el estrés oxidativo que provocan una respuesta inmunoinflamatoria en la pared, destrucción de la matriz extracelular y apoptosis de las células de músculo liso vascular.

La respuesta inmunoinflamatoria se caracteriza por la infiltración de células inflamatorias como neutrófilos, macrófagos y linfocitos T y B, que favorece la degradación de fibras elásticas y colágeno (Wassef, M., 2001). La secreción de enzimas proteolíticas, como metaloproteinasas (MMPs), por los leucocitos y células de músculo liso vascular, dan lugar a la destrucción de la matriz extracelular de la aorta y la formación del aneurisma (Hannawa, K.K., 2006). Esta degradación proteolítica junto con la remodelación de la capa de elastina y colágeno está asociada con el debilitamiento y dilatación del aneurisma, haciendo el aneurisma más propenso a su rotura (Hellenthal, F.A., 2009 1ª y 2ª parte). Por otro lado, el estrés oxidativo, es un factor que contribuye a la inflamación y está ampliamente involucrado en la patogénesis del AAA. En presencia de daño tisular el estrés oxidativo está relacionado con una mayor producción de especies reactivas de oxígeno (ROS; *reactive oxygen species*). La hipertensión, uno de los factores de riesgo en el AAA, puede contribuir al aumento de ROS. Varios estudios han demostrado que marcadores de estrés oxidativo como la óxido nítrico sintasa, nitrotirosina, nitritos, NADPH oxidasa y p22phox están incrementados en la media y la adventicia del aneurisma en comparación con la aorta normal, siendo estos resultados reproducidos en modelos experimentales (Kuivaniemi, H., 2008)(Henderson, E.L., 1999)(Forester, N.D., 2005).

También se ha observado un acortamiento de telómeros en linfocitos de pacientes con AAA (Wilson, W.R., 2008)(Atturu, G., 2008), el cual está asociado a un aumento de estrés oxidativo e inflamación. Estos resultados sugieren que el estrés oxidativo es un mecanismo importante en el desarrollo del AAA y que se encuentra aumentado en estos pacientes (Trouba, K.J., 2002).

Hay que destacar que con frecuencia se suelen formar trombos en el interior del aneurisma que pueden crecer a lo largo de la pared arterial, aumentando la dilatación de la arteria que con el tiempo puede causar la rotura del vaso. El incremento del diámetro del aneurisma se correlaciona con un incremento del trombo (Wolf, Y.G., 1994). Aunque las investigaciones en ratones genéticamente deficientes han identificado la existencia de mecanismos claves en la formación y progresión del aneurisma, el conocimiento fisiopatológico de la enfermedad humana permanece incompleto. En este sentido cabe destacar que los modelos murinos de aneurismas no desarrollan trombo intraluminal, mientras que la dilatación de la aorta humana suele ir acompañada frecuentemente de la formación de un trombo intraluminal.

2.2. Formación e importancia del trombo intraluminal.

La formación del trombo puede ser considerado un mecanismo de compensación en respuesta a las perturbaciones del flujo debido a la dilatación de la aorta por la formación del aneurisma (Martinez-Pinna, R., 2011). La presencia del trombo intraluminal (ILT; *intraluminal thrombus*) también está relacionado con el crecimiento y la rotura del AAA (Swedenborg, J., 2006), siendo el tamaño del ILT un factor que aumenta el riesgo de rotura, así como la presencia de fisuras y calcificaciones en el trombo (Labruto, F., 2011). El 97% de los aneurismas con diámetro superior a 5cm contienen un ILT que se forma en la pared del aneurisma (Hans, S.S., 2005). Estudios realizados en autopsias de pacientes que murieron por rotura del aneurisma, muestran que la rotura se realiza por debajo del ILT, lo que sugiere que el trombo tiene un efecto de debilitamiento en la pared arterial (Simao da Silva, E., 2000).

El ILT está formado por diferentes capas que desde el interior al exterior del vaso se dividen en: la capa luminal, una zona intermedia y la capa abluminal. Es importante destacar que existe un movimiento dinámico de moléculas a través de las distintas capas del trombo, así como una renovación constante de los componentes celulares y plasmáticos de la capa luminal (Adolph, R., 1997) (Figura 3).

La capa luminal, que está en contacto con el flujo sanguíneo, es la más activa biológicamente y se caracteriza a nivel celular por la acumulación de neutrófilos, plaquetas y eritrocitos; y a nivel biológico destaca por poseer una alta actividad oxidativa y proteolítica (Kazi, M., 2003).

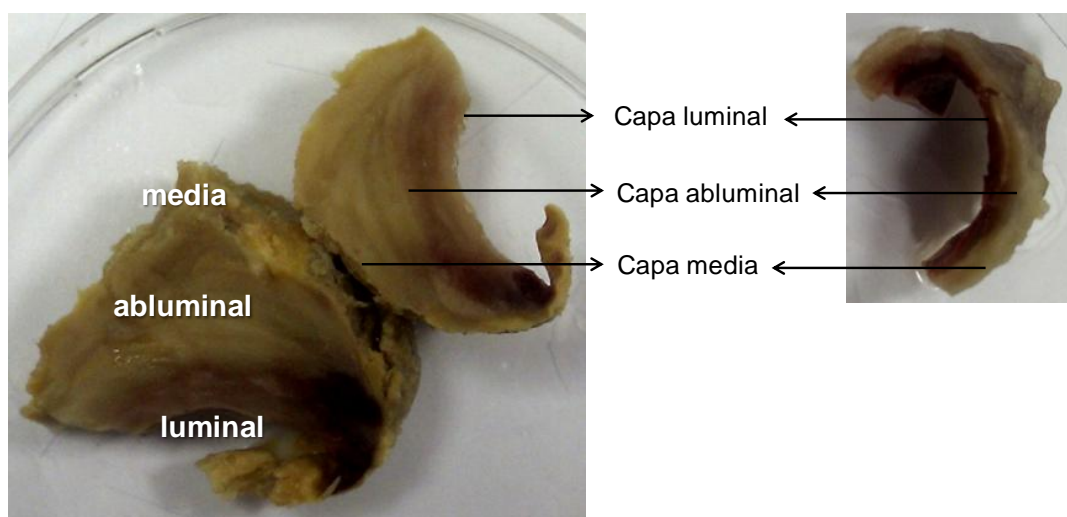


Figura 3: Imagen de la diferentes capas del trombo intraluminal humano.

2.2.1. Leucocitos Polimorfonucleares.

Los polimorfonucleares (PMNs) son los principales leucocitos circulantes en la sangre, y pueden contribuir en el desarrollo del AAA por su implicación en la formación del ILT, por su participación en el estrés oxidativo, en la degradación proteolítica de la capa media y en la inflamación de la adventicia (Michel, J.B., 2011). Los PMNs se activan y se adhieren al trombo durante su formación (Leclercq, A., 2007) (Kolodgie, F. D., 2003) y su presencia en la parte luminal del trombo junto con células rojas, representan las causas principales del daño oxidativo en aneurismas. La liberación de mieloperoxidasa, NADPH oxidasa y óxido nítrico sintasa, secretadas por PMNs genera una gran cantidad de ROS, como el anión superóxido, radicales hidroxilos y peroxinitritos (Balla, J., 2007).

Los PMNs, se activan y liberan proteasas que contribuyen al debilitamiento de la pared del AAA (Folkesson, M., 2011), como han demostrado en experimentos de modelos murinos que destacan la importancia de los neutrófilos en el desarrollo del aneurisma (Hannawa, K.K., 2006). La degranulación de PMNs permite la liberación de enzimas, como la elastasa y metaloproteinasa-9 (MMP-9), al compartimento extracelular que degrada las proteínas de la matriz extracelular como elastina, fibronectina, trombospodina y vitronectina (Galdston, M., 1979) (Gecthman, Z., 1997) (Bonney, A., 2000).

Así, la presencia de neutrófilos en el trombo del AAA tiene un papel importante en la apoptosis de células del músculo liso vascular (Mtairag, E.M., 2002) (Fontaine, V., 2002) (Fontaine, V., 2004), dando lugar a un aumento de la inflamación en la capa adventicia caracterizada por la participación de linfocitos y macrófagos (Houard, X., 2007) que conlleva la ausencia de una posible reparación (Figura 4).

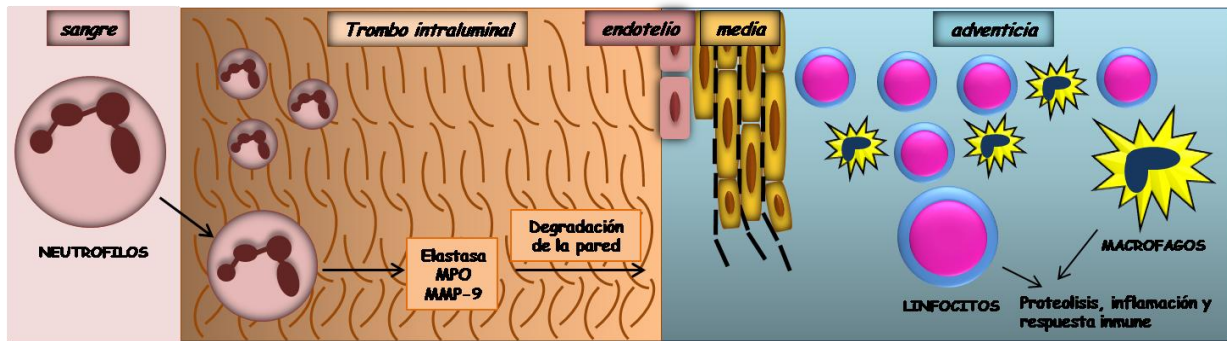


Figura 4: Representación esquemática del papel de los neutrófilos en el AAA. En la capa luminal del ILT, los neutrófilos liberan enzimas proteolíticas y de estrés oxidativo que degradan la pared.

2.2.2. Plaquetas.

El AAA está asociado con una alteración en la hemostasia y una activación de células endoteliales y plaquetas (Norman, P., 2004). Las plaquetas tienen una implicación directa en la formación y desarrollo del ILT, se adhieren a la pared de la aorta dando lugar a reacciones de coagulación y atracción de otros tipos celulares como monocitos, neutrófilos, etc. Se ha observado que una reducción del número de neutrófilos en el trombo puede ser consecuencia de la inhibición plaquetaria, reduciéndose así la progresión del AAA (Touat, Z., 2006) (Lindholt, J.S., 2008). Las plaquetas interactúan con los neutrófilos a través de P-selectinas y las integrinas $\beta 2$ y $\beta 3$. La familia de las selectinas la forman tres moléculas de adhesión: E-selectina se encuentra en la superficie de células endoteliales, P-selectina que se localiza en células endoteliales y en plaquetas activadas y L-selectina que se expresa constitutivamente en leucocitos. La función principal de la P-selectina es el reclutamiento de leucocitos a las zonas de inflamación, siendo una molécula de adhesión expresada en la superficie de las células endoteliales (Gamble, J.R., 1990) y en plaquetas activadas (Yokoyama, S., 2005). Se ha descrito que la P-selectina está implicada en la patofisiología de la enfermedad cardiovascular y en la formación y evolución del trombo arterial. En plaquetas en reposo las selectinas se almacenan en las membranas de los gránulos alfa y tras la activación se redistribuyen a la superficie de las plaquetas e inician la adhesión a leucocitos. La función de la P-selectina es atrapar a los leucocitos mediante la unión a la glicoproteína 1, una proteína de membrana que se expresa en la superficie celular de los leucocitos. La P-selectina presente en la superficie de plaquetas y células endoteliales interacciona con los leucocitos en eventos cardiovasculares representando una diana molecular importante tanto en fase aguda como en enfermedades crónicas (Rouzet, F., 2011). Sin las selectinas el reclutamiento celular en fases tempranas y tardías de la formación del AAA se ve disminuido (Arbonés, M.L., 1994)(Bullard, D.C., 1995)(Bullard, D.C., 1996), posiblemente debido a un descenso de la interacción plaquetas-leucocitos reduciendo la activación de estas células y reduciendo la liberación de citoquinas al medio.

2.2.3. Eritrocitos.

Los eritrocitos también juegan un papel clave en la formación del ILT. El aumento de hierro observado en tejido de AAA implica la lisis de glóbulos rojos y la eritrofagocitosis con la consecuente liberación de hemoglobina (Hb). La Hb, que es un agente pro-oxidante, cuando se oxida transfiere el grupo hemo al endotelio y a las lipoproteínas. Como defensa al estrés oxidativo producido por la Hb hay una mayor producción de hemo-oxigenasa 1 y ferritina (Balla, J., 2007). Recientemente se ha demostrado *in vivo* la captación de óxido de hierro por la capa luminal del trombo del AAA, lo que podría reflejar fagocitosis por leucocitos (Nchimi, A., 2010). El almacenamiento de hierro por eritrofagocitosis u otras causas dentro de las lesiones vasculares podría tener un papel importante en la progresión de la enfermedad ya que el grupo hemo potencia la citotoxicidad celular mediada por leucocitos y otras fuentes de ROS (Balla, J., 2007). Además, se ha demostrado que el aumento de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) provoca la translocación de enzimas antioxidantes a la membrana de eritrocitos como la peroxirredoxina-1 (Prdx-1), dando lugar a la liberación de estas enzimas al medio. Se ha observado en el tejido del AAA un aumento de enzimas antioxidantes como, superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa, tioredoxina y Prdx-1 (Dubick, M.A., 1999)(Martinez-Pinna, R., 2010). Estas enzimas constituyen un sistema que regula el estado redox celular, pudiendo interactuar y modular la actividad de la NADPH mediante la inactivación de H_2O_2 (Leavey, P.J., 2002).

Por todo lo expuesto anteriormente, el estudio de células implicadas en la formación y desarrollo del ILT, neutrófilos, plaquetas y eritrocitos, pueden proporcionar nuevas herramientas para el tratamiento del AAA que actúen directamente sobre la formación y el desarrollo del trombo.

3. Biomarcadores.

Un biomarcador se puede definir como una molécula de naturaleza proteica o péptida, un gen o un producto metabólico que represente un proceso biológico en un organismo en un momento determinado y que se pueda medir fácilmente (Becker, R.C., 2007), de manera que es posible que pueda expresarse de forma diferencial en situaciones anormales o patológicas. Por ello, la búsqueda de marcadores biológicos se ha convertido en uno de los principales objetivos en la investigación para ayudar en el diagnóstico, pronóstico y tratamiento de diversas patologías. El desarrollo de ciertas tecnologías, principalmente las relacionadas con aproximaciones proteómicas, constituye una herramienta fundamental para encontrar marcadores biológicos en muestras humanas.

Las aplicaciones clave en la enfermedad vascular son la identificación de pacientes de alto riesgo para la rotura de la placa ateromatosa, el crecimiento y la rotura del aneurisma, o detección de cardiomiopatía temprana. Es importante la especificidad y sensibilidad del marcador, y que el riesgo pronosticado coincida con el riesgo real observado para poder clasificar los pacientes en las categorías clínicas pertinentes. Además, la identificación de biomarcadores implicados en la patogénesis del aneurisma pueden ser

utilizados para una inhibición farmacológica del crecimiento del AAA. Estos biomarcadores nos permitirían estratificar el riesgo y evaluar el grado de enfermedad y aplicar un tratamiento adecuado al nivel de enfermedad, con el fin de evitar tanto el crecimiento como la posible rotura del aneurisma (Nordon, I., 2009).

Los biomarcadores ideales son aquellos que están directamente relacionados con la patofisiología de la enfermedad, que son económicamente asequibles y de fácil disponibilidad. El diámetro del aneurisma es el marcador más importante de rotura del aneurisma, ya que el riesgo de rotura aumenta con la expansión del aneurisma (Urbonavicius, S., 2008). En este sentido, se han visto alteraciones en marcadores de remodelación de la matriz extracelular en pacientes con aneurismas pequeños (Hellenthal, F.A., 2012). El péptido de elastina sérico parecer ser un biomarcador de tamaño y rotura de aneurisma (Lindholt, J.S., 2001), o el activador de plasminógeno en suero también ha sido descrito como un buen marcador de expansión del aneurisma (Lindholt, J.S., 2006). Otros marcadores serían los de actividad trombótica como el complejo plasmina-antiplasmina (PAP) y AAT. Se ha observado que los niveles de complejos PAP y D-dímeros (DD) están elevados en los pacientes con AAA y se correlacionan con la progresión de la enfermedad (Golledge, J., 2008). Así mismo, elevadas concentraciones de fibrinógeno en plasma pueden predecir un mayor riesgo de trombosis. Por ello se ha visto que los niveles de fibrinógeno están aumentados en pacientes con AAA en comparación con los controles, y que existe una correlación positiva entre el tamaño AAA y el ILT, y la concentración de fibrinógeno (Al-Barjas, H.S., 2006). Se ha demostrado que el fibrinógeno y la fibrina son abundantes en la parte luminal del trombo, siendo esta zona la que muestra una mayor activación del sistema fibrinolítico en el ILT (Houard, X., 2007).

Por otro lado, se han descrito diferentes moléculas liberadas por neutrófilos como biomarcadores de AAA. Una de estas enzimas es la MMP-9 que es liberada por los neutrófilos presentes en el ILT y se une a la *Neutrophil gelatinase-associated lipocalin* (NGAL) formando el complejo MMP-9/NGAL que se localiza mayoritariamente en la capa luminal del trombo (Folkesson, M., 2007). NGAL se une a MMP-9 evitando su degradación (Ferguson, D.G., 2010). También se ha observado que la mieloperoxidasa (MPO) una enzima localizada en los gránulos de los neutrófilos y macrófagos, es liberada al medio extracelular durante los procesos inflamatorios. También se sabe que MPO está implicada en la oxidación de lípidos, además consume óxido nítrico (NO) del endotelio reduciendo la disponibilidad de NO y como consecuencia la disminución de vasodilatación (Loria, V., 2008). Ambas proteínas MMP-9 y MPO se han descrito que están aumentadas en pacientes con AAA (Houard, X., 2007).

Las células infiltradas en el aneurisma liberan numerosas citoquinas, que producen activación y expresión de varias proteasas (Rizas, K.D., 2009). En diferentes estudios se han observado niveles elevados de IL-1b, (interleuquina-1b) IL-6 (interleuquina-6), TNF- α (factor de necrosis tumoral) y IFN- γ (interferón- γ) en pacientes con AAA. Estas citoquinas están implicadas en el desarrollo y patogénesis del aneurisma (Juvonen, J., 1997) (Rohde, L.E., 1999) (Pearce, W.H., 1992).

La IL-6 induce la producción de proteína C reactiva (PCR) en el hígado (Soong, C.V., 1993). Entre estos posibles biomarcadores, se ha observado un incremento de marcadores inflamatorios como pueden ser inmunoglobulina G y PCR. La PCR esta descrita como un marcador de eventos cardiovasculares y ha sido asociada con el tamaño del AAA pero no con el crecimiento (Norman, P., 2004) (Ridker, P.M., 2005).

4. Proteómica.

En los últimos años se ha producido un gran avance en la proteómica, ciencia que estudia la expresión de proteínas a nivel global empleando para ello una serie de técnicas que permiten el análisis de todas las proteínas presentes en una muestra biológica (Blackstock, W.P., 1999) (Pandey, A., 2000). El estudio del proteoma es, probablemente, el sistema experimental más adecuado para analizar células y tejidos, puesto que examina directamente el producto final del genoma. El proteoma es la dotación completa de proteínas (Wilkins, M.R., 1996), por lo que la descripción del proteoma permite tener una imagen dinámica de todas las proteínas expresadas, en un momento dado y bajo determinadas condiciones concretas de tiempo y ambiente. El estudio y comparación sistemáticos del proteoma en diferentes situaciones fisiológicas y/o patológicas permite identificar aquellas proteínas cuya presencia, ausencia o alteración se correlaciona con determinados estadios fisiológicos y/o patológicos. En el caso concreto del análisis proteómico asociado a estados patológicos, es posible identificar proteínas o biomarcadores (Hanash, S.M., 2008) que permitirían diagnosticar la enfermedad o pronosticar la evolución de la misma.

Este tipo de estudio requiere la utilización de un método de separación de proteínas combinado con la identificación posterior de cada proteína individual, generalmente mediante espectrometría de masas (MS), debido a su mayor sensibilidad y gran capacidad de procesamiento (Mann, M., 2001).

Uno de los principales obstáculos a los que se ha enfrentado la investigación proteómica en los últimos tiempos es la dificultad que supone la identificación de todas las proteínas presentes dentro de una muestra biológica compleja. Este problema se ve agravado por el limitado rango dinámico de concentración que las técnicas actuales son capaces de resolver (Archakov, A.I., 2007). Otros problemas están asociados a la evaluación de la enorme cantidad de información que genera esta tecnología, que complica la selección e interpretación de los datos potencialmente útiles de entre todos los obtenidos.

El campo de la proteómica se ha organizado clásicamente en tres áreas principales:

- Proteómica de expresión, cuya finalidad es la caracterización a gran escala de todas las proteínas contenidas en un tejido, una célula o un órgano.
- Proteómica de expresión diferencial, cuyo objetivo es estudiar de forma comparativa los cambios dinámicos de expresión del perfil proteico, ya sean estables o transitorios, entre un estado celular normal y patológico, o como consecuencia del tratamiento con fármacos u otros estímulos (Eng, J., 1994).

- Proteómica de interacción proteína-proteína (o de mapa celular), que surge de la constatación de que, en los organismos eucariotas, las proteínas normalmente actúan formando complejos con otras proteínas y de que numerosos procesos biológicos están regulados por este tipo de interacciones.
- Proteómica de modificaciones post-traduccionales. Gracias al desarrollo de las herramientas proteómicas, especialmente de la espectrometría de masas, es posible detectar y cuantificar modificaciones postraduccionales en proteínas producidas en situaciones anormales o patológicas.

Para el avance de la proteómica, ha sido necesaria la consolidación de la espectrometría de masas como técnica aplicada al análisis de moléculas biológicas. Esto combinado con el empleo de métodos de fraccionamiento y separación de péptidos y proteínas como la electroforesis bidimensional en geles de poliacrilamida (*2D-polyacrylamide gel electrophoresis*. 2D-PAGE,) (Weiss, W., 2009), ha permitido establecer la proteómica, desde mediados de los años 90 del siglo pasado, como una herramienta útil para el análisis masivo de proteínas.

4.1. Métodos de separación de proteínas.

Puesto que la mayoría de las muestras biológicas son mezclas complejas de proteínas (que no pueden ser analizadas directamente por espectrometría de masas), los estudios proteómicos requieren el uso de una o varias técnicas de separación de proteínas previas al análisis mediante espectrometría de masas. Las más habituales son la electroforesis (especialmente la electroforesis bidimensional, 2-DE) y la cromatografía (sobre todo la cromatografía líquida de alta resolución, HPLC).

4.1.1. Electroforesis bidimensional y tecnología 2D- DIGE.

La electroforesis bidimensional (2-DE, *bidimensional electrophoresis*) es una técnica para la separación de mezclas complejas de proteínas con una gran capacidad resolutive. Consistente en la aplicación sucesiva de dos tipos de electroforesis realizadas sobre la misma muestra (Gorg, A., 2000) (Gygi, S.P., 2000). En primer lugar se realiza un isoelectroenfoque (IEF, *isoelectric focusing*) donde las proteínas se separan en un gradiente continuo de pH en función de su punto isoelectrico (pI). La técnica para generar gradientes de pH inmovilizados (IPG, *immobilized pH gradients*) (Bjellqvist, B., 1982) fue desarrollada inicialmente en los años 70.

Los IPG mejoraron la reproducibilidad entre geles y favorecieron la creación de bases de datos de geles bidimensionales, disponibles en internet (Gorg, A., 1988). A continuación se lleva a cabo una electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE, *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*), donde las proteínas se separan en función de su masa molecular (O'Farrell, P.H., 1975). La dirección del movimiento de las proteínas en esta segunda etapa electroforética es perpendicular a la primera, de manera que se obtiene un mapa de “manchas proteicas” que se distribuye en dos dimensiones.

La tecnología denominada 2D-DIGE (*bidimensional differential in gel electrophoresis*) ha mejorado mucho la capacidad de la 2-DE para realizar análisis comparativos, se basa en el marcaje de las proteínas que componen una mezcla mediante la introducción de grupos N-hidroxi-succinimidil éster derivados de las cianinas fluorescentes (Cy3, Cy5 y Cy2). Estos grupos se unen a los extremos amino terminal ($-\text{NH}_3^+$) de los restos de lisina de las proteínas de la mezcla a través de un enlace amida mediante una reacción química. El marcaje fluorescente es previo a su separación, lo que le otorga una gran precisión en la cuantificación, que además permite la separación de varias muestras proteicas en un mismo gel (Morouga, R., 2005), incrementando la reproducibilidad y la fiabilidad del análisis de expresión diferencial entre muestras (Figura 5).

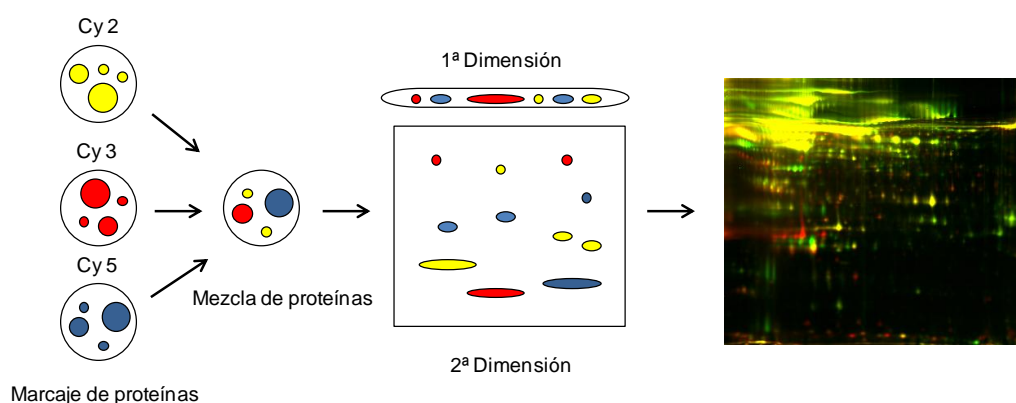


Figura 5: Representación gráfica de la técnica 2D-DIGE. Marcaje de las muestras mediante fluoróforos.

Una vez que la segunda dimensión se ha realizado, las manchas proteicas deben ser visualizadas, para lo cual existen varios métodos de tinción, con diferentes características de sensibilidad, linealidad, homogeneidad y reproducibilidad (Rabilloud, T., 2000). El método más sensible es la tinción con plata, aunque el rango de detección lineal es más amplio en las técnicas que utilizan compuestos fluorescentes (p. ej. SYPRO) (Patton, W.F., 2000).

El resultado es una distribución bidimensional de las proteínas en manchas o *spots*. La identificación de las proteínas se lleva a cabo por digestión directa de la mancha o *spot* de la proteína que queremos identificar en el gel donde se han separado las proteínas, usando proteasas (generalmente tripsina) y analizando los péptidos obtenidos mediante espectrometría de masas. La identificación de la proteína se hace a través de la obtención de huellas peptídicas (Henzel, W.J., 1993) (James, P., 1993), que es el conjunto de fragmentos peptídicos que se obtienen tras tratar una proteína concreta con una proteasa determinada (Perkins, D.N., 1999). La huella péptica es característica de cada proteína y depende de la enzima con la que se fragmente. Actualmente hay numerosas bases de datos que recogen las huellas peptídicas de multitud de proteínas conocidas, las cuales se pueden rastrear usando programas bioinformáticos para buscar la huella peptídica que corresponda con la de la proteína que se esté estudiando y por tanto poder identificarla (Pandey, A., 2000).

4.1.2. Espectrometría de masas.

La espectrometría de masas es una técnica analítica que emergió a finales de los años 80 para el análisis de proteínas (Karas, M., 1988) (Fenn, J.B., 1989), aunque se introdujo en el ámbito del análisis de biomoléculas al final de la década de los años 70 (Roepstorff, P., 1992), convirtiéndose rápidamente en uno de los métodos más utilizados en química analítica.

Los espectrómetros de masas miden la relación masa/carga (m/z) de iones generados a partir de un analito, permitiendo la caracterización de un gran número de moléculas a partir de su espectro de masas (MS). Las operaciones básicas de un espectrómetro de masas son la ionización de la muestra, la separación de iones por un campo eléctrico, dispersión de los iones según su m/z y su posterior detección midiendo intensidades de flujos iónicos (Gilman, S.D., 2006).

El diagrama de bloques de la figura 6 muestra los componentes principales de los espectrómetros de masas. El objetivo del sistema de entrada es introducir una pequeña cantidad de muestra (un micromol o menos) en el espectrómetro de masas, donde sus componentes se convierten en iones gaseosos.

La fuente de iones de un espectrómetro de masas convierte los componentes de una muestra en iones por bombardeo con electrones, iones, moléculas o fotones. Alternativamente, la ionización se lleva a cabo por energía térmica o eléctrica. En ambos casos, lo que se obtiene es un haz de iones positivos o negativos (frecuentemente positivos) que es entonces acelerado en el analizador de masas. Un hecho característico de los espectrómetros de masas es la necesidad de un sistema de vacío adecuado para mantener bajas presiones en todos los componentes del instrumento excepto el procesador de señal y el dispositivo de lectura.

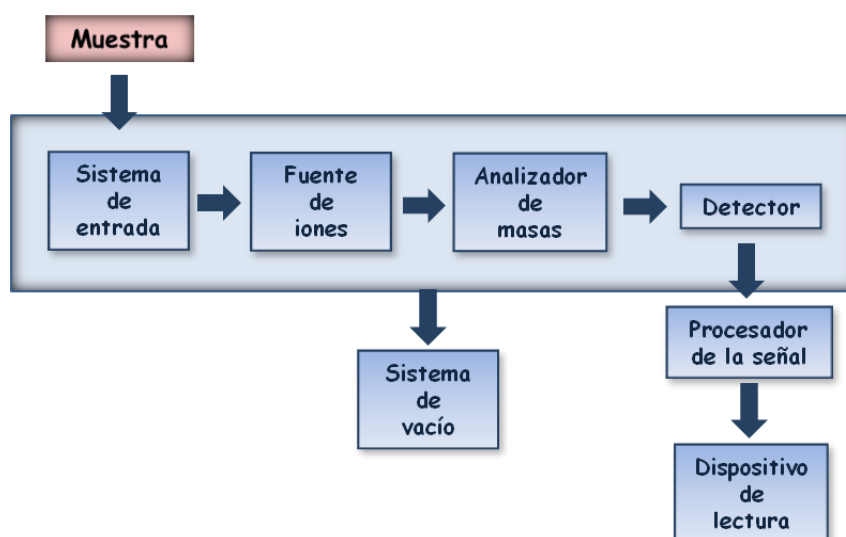


Figura 6. Componentes de un espectrómetro de masas.

4.1.2.1. MALDI-TOF.

El MALDI-TOF es una técnica de ionización suave utilizada en espectrometría de masas. Se denomina MALDI por sus siglas en inglés *Matrix- Assisted Laser Desorption/Ionization* (desorción/ionización láser asistida por matriz) y TOF por el detector de iones que se acopla al MALDI y cuyo nombre procede también de sus siglas en inglés *Time-Of-Flight* (tiempo de vuelo). El proceso de ionización mediante MALDI produce la vaporización inducida por láser de una mezcla sólida de un analito (proteína o péptido) y una matriz depositada en una placa metálica (Figura 7A). Se utiliza una matriz para proteger a la biomolécula de ser destruida y para facilitar la vaporización y la ionización. La muestra es entonces irradiada con un láser pulsado, esta energía del láser expulsa iones de la matriz electrónicamente excitados, cationes y macromoléculas neutras, que crean una densa nube de gas por encima de la superficie de la muestra. La aplicación de potencial eléctrico elevado (20-25 KV), acelera los iones desde la placa de muestra hasta el tubo de vuelo del analizador TOF, donde no existe campo eléctrico alguno. Para un voltaje de aceleración dado, el tiempo de vuelo empleado por un ión para llegar al detector (microsegundos), es proporcional a su m/z . De esta manera, los péptidos pequeños vuelan más rápido que los mayores, por lo que el detector captará las masas en orden creciente (modo lineal). El resultado es la representación de la intensidad (abundancia) de cada péptido frente a la relación m/z , dando lugar al espectro de masas (Cotter, RJ., 1992) (Hoffman, E., 2003).

Es posible mejorar la resolución de MALDI-TOF empleando un espejo de iones o “reflector” al final del tubo de vuelo (Figura 7B) (Mann, M., 2001). En el reflector, los iones son reflejados hacia el detector, compensando las pequeñas diferencias de energía cinética que puedan llevar dos iones idénticos, lo que aumenta mucho la exactitud en el rango de detección. La unión de dos analizadores TOF (MALDI-TOF/TOF) mediante una cámara de colisión situada entre ellos (Figura 7B) permite el aislamiento y la fragmentación de péptidos para analizar su secuencia de aminoácidos (Medzihradszky, K.F., 2000).

La posterior identificación se consigue tras comparar los espectros obtenidos con una base de datos obtenidos por espectrometría de masas empleando softwares específicos (Eng, J.K., 1994). El resultado obtenido es una proteína candidata con un grado de fiabilidad determinado. Aunque esta estrategia es muy potente, tiene ciertas limitaciones: por ejemplo, las proteínas pequeñas y las muy grandes no son fáciles de analizar mediante electroforesis bidimensional, así como las proteínas de membrana debido a su hidrofobicidad; además, las proteínas poco abundantes, que por lo general juegan un papel fisiológico importante, son difíciles de detectar (Shevchenko, A., 1996).

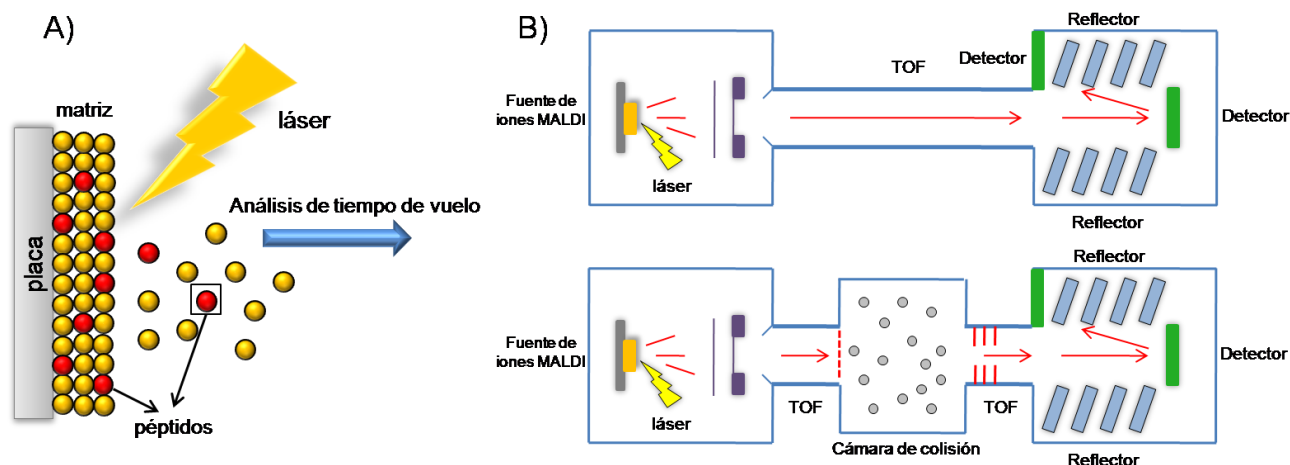


Figura7: A) Un pulso láser irradia la muestra, que se encuentra sobre una placa, causando la ionización y la vaporización de los péptidos. B) Representación esquemática de un espectrómetro de masas de tipo MALDI-TOF. Los péptidos son acelerados mediante un pulso láser y se dirigen al tubo de vuelo (TOF), los iones llegan al detector que aplica la señal mediante reflectores. Y representación esquemática de un espectrómetro de masas de tipo MALDI-TOF/TOF. Al igual que en el caso anterior, los péptidos son acelerados y se dirigen al tubo de vuelo (TOF), donde hay una cámara de colisión en cuyo interior los péptidos son fragmentados y acelerados por un nuevo campo eléctrico que los dirige hacia el segundo tubo de vuelo (TOF) y llegan finalmente al detector.

5. Técnicas complementarias a la proteómica: Columnas cromatográficas.

Las limitaciones técnicas de la proteómica se refieren principalmente a la sensibilidad para detectar proteínas poco abundantes, proteínas hidrofóbicas y básicas (Garbis, S., 2005). Las proteínas poco abundantes pueden estar enmascaradas por las proteínas más abundantes, por ejemplo, la albúmina en el suero. Las proteínas hidrofóbicas y básicas tienen una solubilidad que puede conducir a la precipitación y agregación. La reproducibilidad entre laboratorios se ha mejorado con la mecanización de las técnicas de alto rendimiento, pero la discriminación de los cambios en las proteínas debido a la variación interindividual sigue siendo un desafío (Sinha, A., 2007).

La sangre es una muestra de fácil obtención y manipulación, lo que la convierte en la más importante desde el punto de vista clínico y posiblemente en la más apropiada para la búsqueda de biomarcadores. El plasma ha sido tradicionalmente el elemento de la sangre más estudiado, ya que su constante perfusión por todo el cuerpo le permite recoger información sobre el estado fisiológico de las diferentes partes del organismo (Vivanco, F., 2005), utilizándose de forma rutinaria en la práctica clínica (Anderson, N.L., 2002). Sin embargo, la búsqueda de biomarcadores en plasma mediante una aproximación proteómica es una tarea muy complicada, raramente empleada en proteómica clínica en sus inicios, debido a que su proteoma es probablemente el más complejo del cuerpo humano (Anderson, N.L., 2002). El rango dinámico de las proteínas en el plasma hace el análisis muy difícil, así un pequeño número de proteínas como la albúmina, 2-

macroglobulina, transferrina, y las inmunoglobulinas pueden representar más del 90% de las proteínas plasmáticas (Bjorhall, K., 2005). Por eso se han ido desarrollando diferentes métodos para evitar estos inconvenientes, técnicas como columnas cromatográficas de afinidad o sistemas de fraccionamiento de proteínas. En el caso de las columnas nos permiten separar proteínas mayoritarias en el plasma (albumina, IgG, IgA, antitripsina, transferrina, haptoglobina, fibrinógeno...) de otras proteínas menos abundantes que pueden quedar enmascaradas por estas. De este modo podemos obtener dos fracciones del plasma una con las proteínas más abundantes y otra con las proteínas menos abundantes (Figura 8).

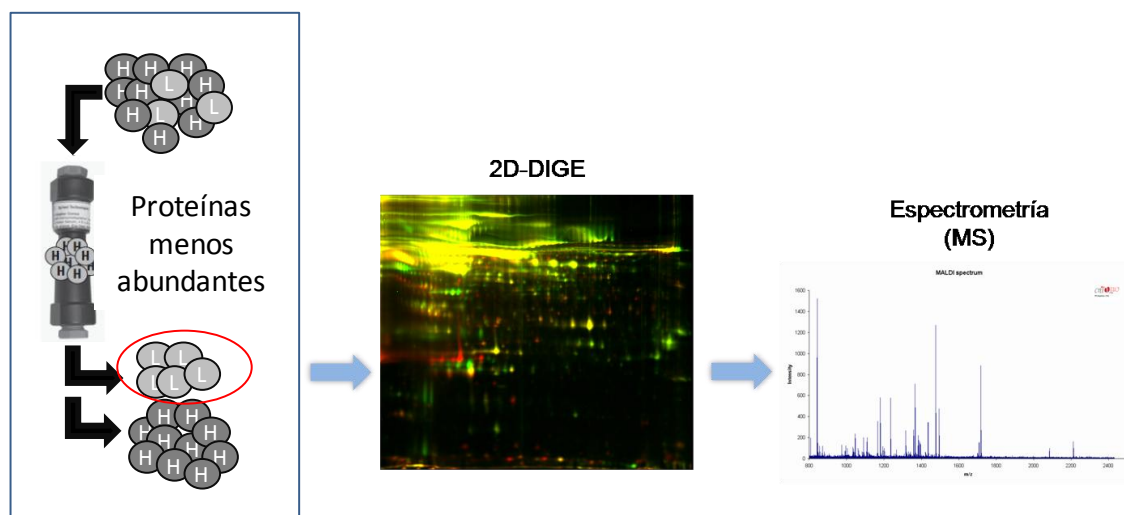


Figura 8: Columna de afinidad que nos permite separar la proteínas más abundantes de las menos abundantes en una muestra, para su posterior análisis proteómico.

También es interesante el estudio de las células sanguíneas, como fuentes alternativas de marcadores (Vivanco, F., 2005). En cambio, requieren un aislamiento cuidadoso para evitar contaminaciones de otras células presentes en la sangre, así como rapidez y cuidado en su tratamiento para evitar su posible activación de forma artificial. La búsqueda de biomarcadores en células circulantes usando estrategias proteómicas se ha convertido en una aproximación fructífera, teniendo en cuenta que las células circulantes, como el plasma, suponen una muestra de fácil acceso y son células esenciales en el desarrollo del proceso aneurismático, desde la formación de la dilatación y el ILT. Todo esto hace pensar que el análisis proteómico de estas muestras puede proporcionarnos información sobre la biología del proceso aneurismático y permitirnos identificar nuevos biomarcadores potenciales de esta enfermedad.

Las proteínas más abundantes pueden ser separadas en columnas de afinidad, sin embargo la depleción de proteínas como la albúmina puede implicar una pérdida no específica de otras proteínas menos abundantes (como las citoquinas) que pueden ser importantes en la fisiopatología de la enfermedad (Granger, J., 2005).

6. Otras técnicas proteómicas: "Arrays" de proteínas.

Los "arrays" de proteínas, nos permiten realizar el estudio de una mezcla compleja de proteínas involucradas en un mecanismo patológico en un sólo experimento mediante el uso de anticuerpos específicos. Esta técnica presenta una alta sensibilidad, reproductividad y requiere poca cantidad de muestra. El array consiste en un portaobjetos estándar con 16 pocillos, en cada uno de los cuales hay las mismas citoquinas por cuadruplicado con su respectivo control positivo y negativo. La técnica es similar a un sándwich-ELISA (Huang, R.P., 2001), se pega un anticuerpo a la superficie del cristal y después de la incubación con la muestra las citoquinas se quedan unidas al anticuerpo. Se añade un segundo anticuerpo biotinilado que se une al complejo citoquina-anticuerpo y por último podemos visualizar el complejo añadiendo biotina-streptavidina que nos permite cuantificar las citoquinas que se encuentran en cada muestra (Lin, Y., 2003) (Figura 9).

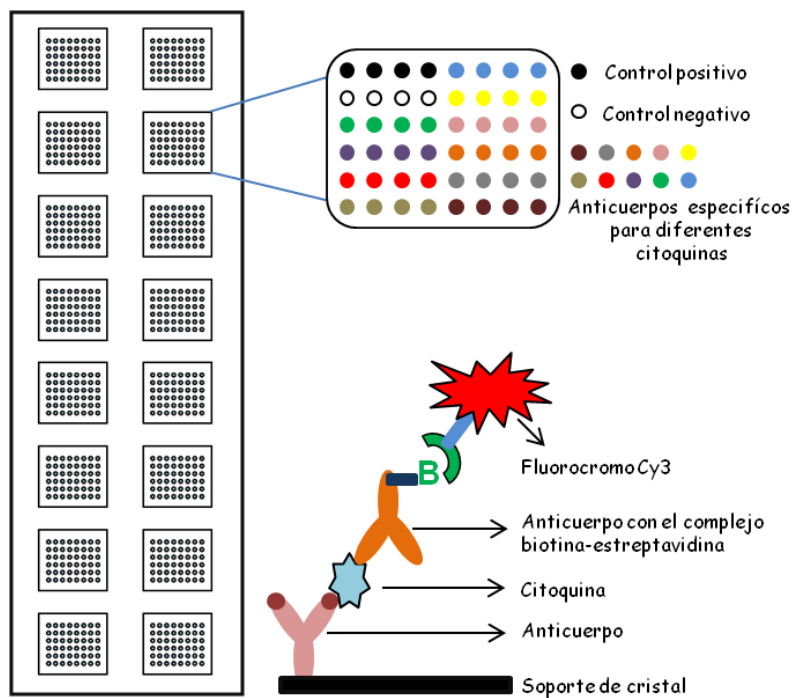
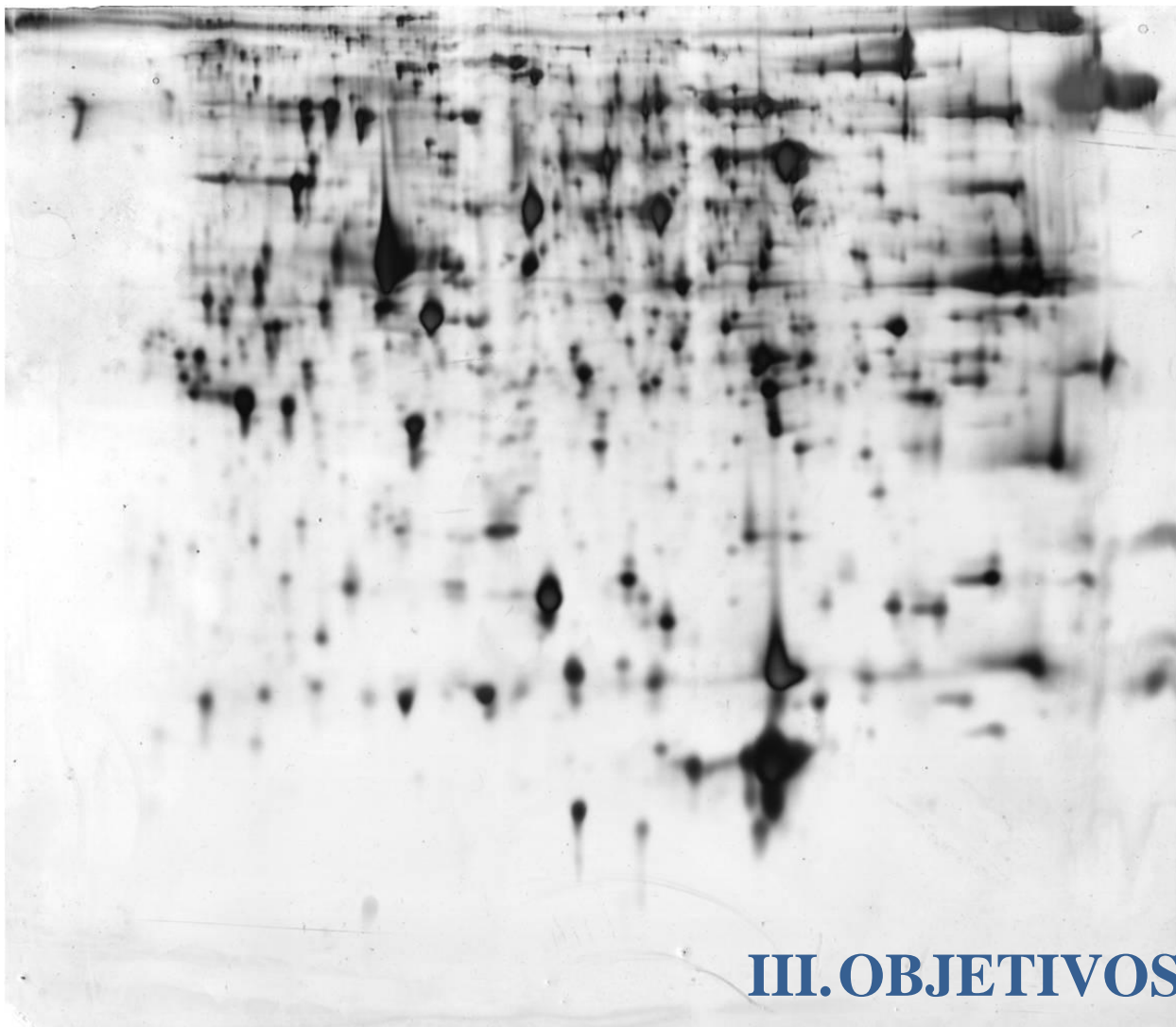


Figura 9: Representación de la técnica usada en los arrays de proteínas.

Esta técnica es complementa al estudio proteómico en el plasma, debido a la posibilidad de poder perder información de las citoquinas tras la depleción del plasma.



OBJETIVOS:

Debido a que el aneurisma de aorta abdominal no presenta una sintomatología característica y puede permanecer estable durante muchos años, el objetivo principal de esta tesis fue la búsqueda de posibles biomarcadores circulantes de la enfermedad aneurismática. Con estos biomarcadores podemos estratificar el riesgo y evaluar el grado de enfermedad y aplicar un tratamiento, con el fin de evitar tanto el crecimiento como la posible rotura del aneurisma. Nos planteamos los siguientes objetivos:

1. Identificación de proteínas diferenciales en plasma de pacientes, mediante el uso de 2D-DIGE y de *arrays* de proteínas.
2. Identificación de proteínas diferenciales en plaquetas y polimorfonucleares circulantes de pacientes comparados con un grupo control, mediante la técnica 2D- DIGE.
3. Validación de los resultados obtenidos en el estudio proteómico de PMNs:
 - 3a) Analizar el posible papel de la catalasa como biomarcador de AAA.
 - 3b) Analizar el papel de la CypA como un biomarcador de la progresión del AAA, así como el papel de la CypA extracelular en la modulación del equilibrio redox en la pared vascular.
 - 3c) Analizar si los niveles de NGAL pueden reflejar una activación de los neutrófilos en pacientes con AAA. Estudio del papel biológico de NGAL en la patogénesis del AAA en un modelo murino.



IV. MÉTODOS Y RESULTADOS

Para desarrollar el objetivo 1 realizamos un análisis proteómico mediante la técnica 2D-DIGE en plasma de pacientes con AAA (diferenciando dos grupos de pacientes según el diámetro del aneurisma; aaa, 3-5cm y AAA, >5cm) y en plasma de controles sanos. Con esta técnica podemos realizar el estudio masivo de proteínas, sin embargo el gran dinamismo proteico presente en el plasma supone una limitación para esta metodología. El problema que se nos planteaba era que en el plasma están presentes proteínas muy abundantes como albúmina, IgG, haptoglobina etc, que enmascaran a otras proteínas menos abundantes que pueden ser de interés para el estudio de la patología. Por este motivo decidimos deplecionar las muestras de plasma mediante una columna de alta afinidad antes del análisis proteómico, realizando el estudio proteómico de la fracción de proteínas menos abundantes.

1. Análisis proteómico del plasma mediante 2D-DIGE

1.1. Materiales y Métodos:

1.1.1. Depleción del plasma:

El plasma se obtuvo de sangre periférica que fue recogida en tubos EDTA (ácido etileno diamino tetraacético) y centrifugada a 2500 rpm (revoluciones por minuto) durante 15 minutos a temperatura ambiente.

Se deplecionaron 8 muestras de plasma de pacientes, 4 de ellos con diámetro aneurismático entre 3-5 cm y otros 4 con diámetro superior a 5cm. También se deplecionaron 4 muestras de controles sanos. 14 de las proteínas mayoritarias del plasma fueron extraídas mediante la columna de alta afinidad MARS14 (*Multiple Affinity Removal System Column*, Agilent Technologies), por medio de interacciones de afinidad entre las proteínas y la columna. Las proteínas separadas fueron: albúmina, Ig G, Ig A, antitripsina, transferrina, haptoglobina, fibrinógeno, alfa-2-macroglobulina, alfa-1-glicoproteína, Ig M, apolipoproteína A1, apolipoproteína A2, proteína de complemento C3 y transtirretina. Posteriormente las muestras fueron dializadas con buffer de bicarbonato amónico y liofilizadas. Para su uso en el 2D-DIGE fueron resuspendidas en buffer con Tris-HCl 30mmol/L (pH 8.5), urea 7 mol/L, tiourea 2mol/L, CHAPS 40g/L y precipitadas con el kit 2D Clean-up de GE Healthcare. La concentración de proteína final fue medida por el método colorimétrico RC-DC (Biorad).

1.1.2. Electroforesis 2D-DIGE:

Se usaron 50ug de proteína de muestra por 400pmol de fluoróforo. Las muestras fueron marcadas individualmente con los fluoróforos Cy3 ó Cy5, en todos los casos el estándar interno fue marcado con Cy2. La reacción se realizó en hielo y en oscuridad durante 30 minutos. Para la reacción se añadió un 1 uL de lisina durante 10 minutos. Se hace una mezcla de los cuatro pares de muestras marcados con Cy3 y Cy5 con

el estándar interno marcado con Cy2 y posteriormente eran diluidas en buffer de rehidratación (7 mol/L urea, 2 mol/L tiourea, 40 g/L CHAPS, 0.8% IPG Buffer 3-11 NL y azul de bromofenol) con 50 mmol/L DTT.

Para la primera dimensión usamos tiras de 24 cm de agarosa con IPG de 3-11, que fueron rehidratadas pasivamente con 450ul de buffer de rehidratación que contenía DeStrak 97mM (GE Healthcare). Las muestras fueron aplicadas mediante la técnica “*cup loading*” en las tiras de agarosa llevándose acabo la separación por punto isoléctrico en el sistema Protean IEF de Biorad hasta llegar a un total de 60kVh.

Para la segunda dimensión las tiras fueron equilibradas en buffer de equilibrado (6 M urea, 30% glicerol, 2% SDS y azul de bromofenol) durante 15 minutos con un 1% DTT y otros 15 minutos con el mismo buffer con iodoacetamida al 4%. Finalmente se realizó la electroforesis en geles SDS-PAGE al 12% de poliacrilamida. Los geles obtenidos fueron escaneados en el escáner Typhoon 9400 (GE Healthcare), y las imágenes fueron analizadas usando el Decyder software (versión 7.0, GE Healthcare), para la detección y cuantificación de los *spots* de proteínas. La significación estadística se avaluó según cambios en la abundancia, usando el análisis de la *t-student* y ANOVA. Los resultados fueron expresados con un 95% de confianza, para diferencias encontradas de al menos 1.5 veces en cuanto a la relación de volúmenes de manchas o *spots* proteicos (Figura 10).

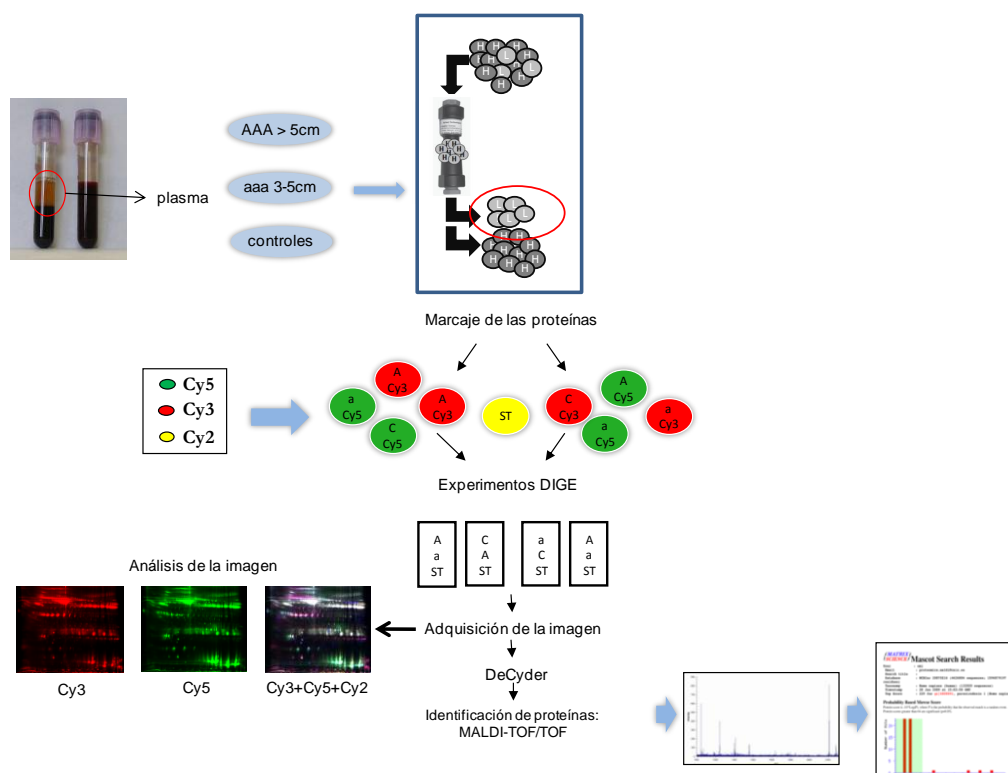


Figura 10: Diseño del experimento 2D-DIGE de plasma.

Posteriormente los geles fueron fijados en buffer de fijación con metanol al 12% y ácido acético al 7%, teñidos posteriormente con plata usando el kit *Plus One silver staining* (GE Healthcare) para visualizar las proteínas diferenciales obtenidas tras el análisis del Decyder.

1.1.3. Identificación de proteínas por MALDI-TOF/TOF:

Los *spots* seleccionados fueron extraídos del gel y digeridos automáticamente con tripsina (Shevchenko, A., 2006). Para la identificación de las proteínas se usó el MALDI-TOF/TOF, en el que las proteínas son ionizadas por un láser que hace que los péptidos se dirijan a través del tubo de vuelo hasta llegar al detector. Se obtuvieron datos combinados de MS y MS/MS. Las huellas péptidicas obtenidas por el MALDI-TOF/TOF se usaron para la búsqueda de las proteínas candidatas mediante el uso del software Mascot de Matrix Bioscience (Perkins, D.N., 1999). Las bases de datos empleadas para hacer las búsquedas fueron las del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI). Para la búsqueda en estas bases de datos, se eliminaron los picos correspondientes de péptidos procedentes de la autólisis de la tripsina, así como aquellos correspondientes a queratinas y derivados de la matriz.

1.1.4. Western blot:

Se recogieron trombos de pacientes con AAA y tras separar las distintas capas, fueron incubados individualmente en medio RPMI (Gibco) suplementado con antibióticos y antimicóticos durante 24 horas a 37° C. Se emplearon 6mL de medio por cada gramo de tejido seco. Pasado el tiempo de incubación se recogió los sobrenadantes y se centrifugaron a 4000 rpm durante 10 minutos. Se cargaron 15ul del medio condicionado de las diferentes capas del ILT y de la capa media en el gel y se realizó una electroforesis en geles SDS-PAGE al 12%. Posteriormente las proteínas se transfirieron a membranas de PVDF (Immobilion-P; Millipore) que fueron bloqueadas durante 1 hora con leche al 10% de TBST [0.01 M Tris (pH 7.7), 0.1 M NaCl y 0.1% Tween 20]. Las membranas se incubaron con anticuerpo frente a RBP-4 (Retinol binding protein 4, proteína de unión al retinol o vitamina A) (HPA001641, sigma 1:500) durante toda la noche a 4°C. Después fueron incubadas con su correspondiente anticuerpo secundario HRP (horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit, dilucción 1:2500).

Finalmente las proteínas fueron detectadas con un kit de quimioluminiscencia (ECL Western Blotting Detection Reagents, Amersham Biosciences) y cuantificadas mediante el programa Quantity One (Quantity One; Bio-Rad Laboratories). El análisis estadístico se realizó mediante un estudio de test-pareado. Se usó un marcador de peso molecular para determinar la banda de nuestra proteína (PageRuler™ *Prestained Protein Ladder*; Fermentas).

1.1.5. ELISA:

La determinación de la concentraciones de RBP-4 en plasma se realizaron con un kit comercial (DRB400, R&D system). El análisis estadístico que se realizó fue la *t-student*.

1.1.6. Inmunohistoquímica:

Las muestras de ILT fueron fijadas en 3.7% de paraformaldehído e incluidas en parafina. Para la inmunohistoquímica se hicieron cortes de 5µm, se usó RBP-4 0.8 µg/mL (Sigma) como anticuerpo primario. Posteriormente se incubó con el anticuerpo secundario y AB Complex/HRP (Vector laboratories) durante 30 minutos. Finalmente los cortes fueron teñidos con 3,3-diaminobenzamina (Dako) y montados con DPX (Dibutifalato, MERCK).

1.2. Resultados:

1.2.1. Análisis DIGE de muestras de plasma de pacientes con AAA:

Las muestra de plasma deplecionadas de 8 pacientes con AAA (4 con diámetro del aneurisma entre 3-5cm y 4 pacientes con diámetro superior a 5cm) y 4 controles sanos fueron analizadas mediante 2D-DIGE (Figura 11A). Tras el análisis con el programa Decyder observamos que el estudio de los componentes principales muestra que los tres grupos de individuos se agrupan entre sí, mostrando características proteicas similares entre ellos, pero a la vez diferenciales entre grupos (Figura 11B).

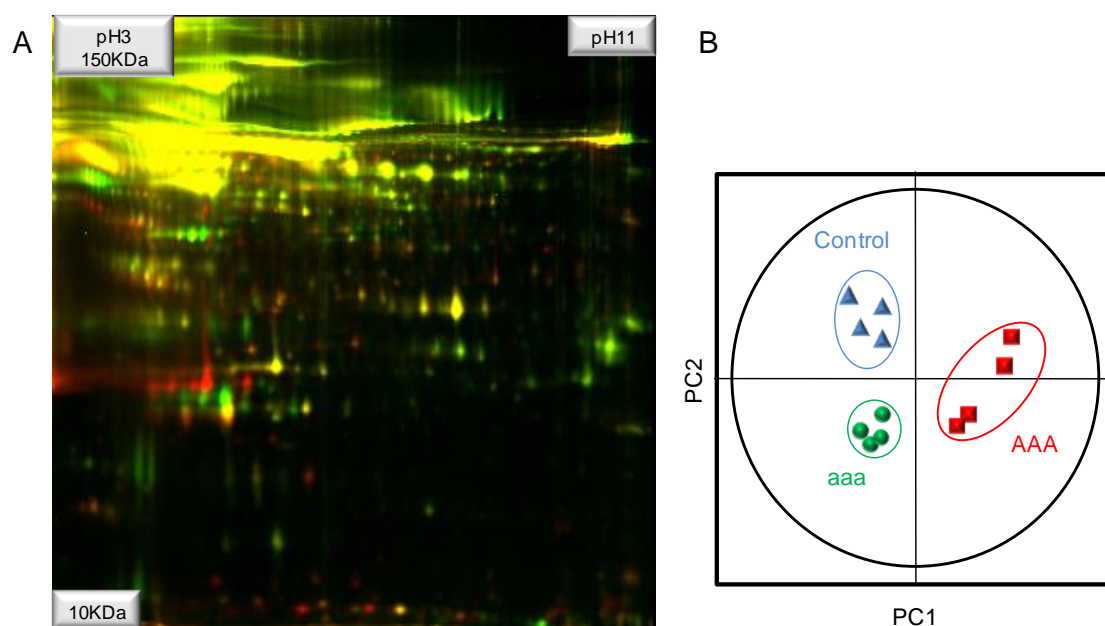


Figura 11: A) Representación de un gel 2D-DIGE de plasma. B) Análisis de componentes principales por el programa Decyder.

Tras el análisis con el MALDI fueron identificadas 32 proteínas diferenciales con una variación del ratio ± 1.5 veces y $p < 0.05$ como valor estadístico asociado a esta variación (Tabla 1). De las proteínas identificadas se observaron proteínas previamente asociadas al AAA como el plasminógeno pero también se identificaron proteínas nuevas como la RBP-4. Es una adipocina asociada al síndrome metabólico que se encuentra aumentada en pacientes con un diámetro del aneurisma de 3 a 5 cm en comparación con el grupo control.

1.2.2. ELISA de RBP-4 en el plasma de pacientes con AAA:

Tras los resultados obtenidos por 2D-DIGE analizamos las concentraciones de RBP-4 en plasma de pacientes con aneurisma pequeño (diámetro 3-5cm: grupo aaa, n=56), pacientes con aneurisma grande (diámetro superior a 5cm: grupo AAA, n= 10) y con sujetos controles (n=39).

Observamos que hay un incremento significativo de los niveles circulantes de RBP-4 en el plasma de pacientes con aneurisma pequeño en comparación al grupo control [43.412(33.769-62.673) vs 27.590 (21.868-37.690) vs 34.842(27.551-47.458) ng/ml, $p<0.05$, Figura 12]. Estos resultados son similares a los obtenidos por 2D-DIGE.

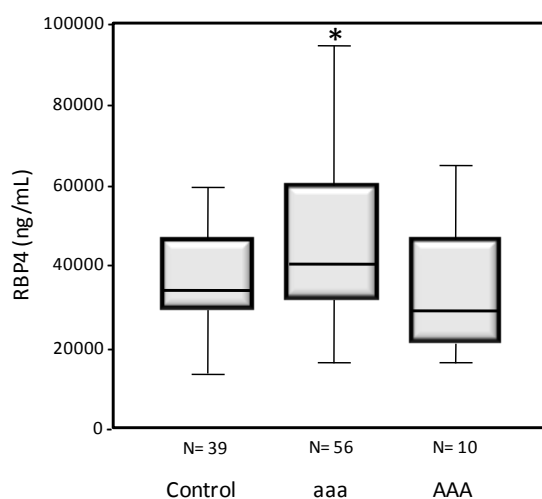


Figura 12: Representación gráfica que la cuantificación de RBP-4 realizada en el plasma de pacientes con AAA.

1.2.3. Western Blot de RBP-4 en sobrenadantes del ILT:

Mediante la técnica de western blot se observaron que los niveles de RBP-4 están aumentados en los sobrenadantes de la capa luminal y abluminal del trombo en comparación con la capa media (458 ± 115 y 432 ± 137 vs 169 ± 64 , unidades arbitrarias, $p<0.05$) (Figura 13A).

1.2.4. Inmunohistoquímica de RBP-4 en el ILT:

Resultados similares a los obtenidos por western blot se observaron por inmunohistoquímica (Figura 13B). Se observa una mayor tinción en la capa luminal en comparación con la abluminal y la capa media. También se observó una tinción difusa lo que nos hace pensar que el RBP-4 podría estar atrapado en el trombo.

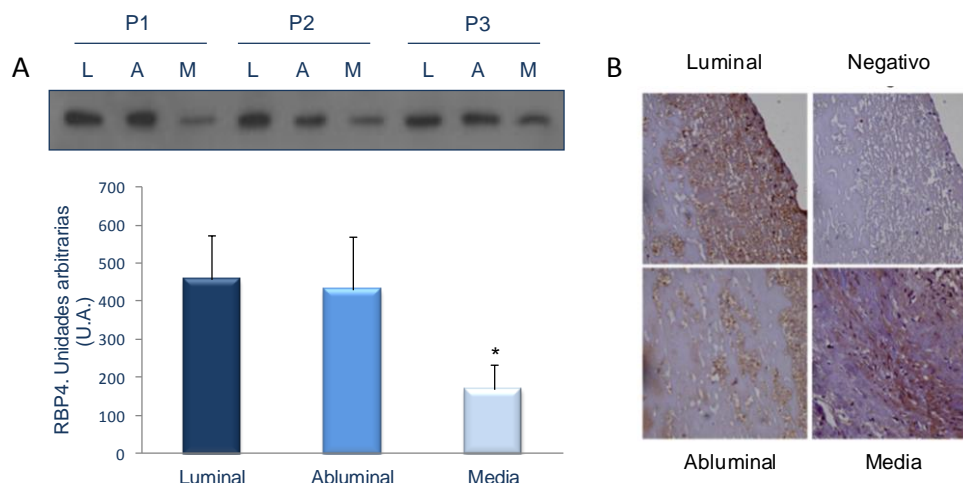


Figura 13: A) Western blot de RBP-4 en medio condicionado de las diferentes capas del ILT (n=7) (*p<0.05 vs luminal). B) Inmunohistoquímica de RBP-4 en tejido del ILT.

Debido a la presencia de proteínas mayoritarias en el plasma, para el análisis proteómico decidimos usar una columna de alta afinidad para quitar 14 de las proteínas mayoritarias presentes en el plasma. Posteriormente se realizó el análisis 2D-DIGE y la identificación proteica por MALDI. Tras el análisis se identificaron un número escaso de proteínas debido posiblemente a la depleción previamente realizada en el plasma de los pacientes. Mediante el análisis por MALDI hemos identificado 32 proteínas diferenciales, incluyendo proteínas que se han descrito asociadas al AAA, por ejemplo, el fibrinógeno proteína asociada con la trombosis siendo un biomarcador común de AAA, que se encuentra aumentada en pacientes. También hemos observado un incremento en la PCR involucrada en procesos inmunoinflamatorios, y la ceruloplasmina cuya concentraciones elevadas se asocia con un mayor riesgo de sufrir un evento cardiovascular.

En nuestro trabajo nos hemos centrado en el estudio de una adipocina, la RBP-4, que esta asociada al síndrome metabólico y que observamos que se encuentra elevada en pacientes con diámetro del aneurisma entre 3 y 5 cm. Estos resultados fueron validados mediante ELISA, corroborando el incremento de RBP-4 en aneurismas pequeños. Finalmente hemos observado un aumento de RBP-4 en el medio condicionado del ILT. Y la presencia de retención de RBP-4 por el trombo que podría explicar la disminución de los niveles de RBP-4 circulantes en el plasma.

El síndrome metabólico se ha definido como la coexistencia de varios factores de riesgo cardiovascular como la hipertensión, la obesidad, la dislipidemia y la alteración del metabolismo de la glucosa. Además el síndrome metabólico se ha relacionado con un mayor riesgo de sufrir algún evento cardiovascular en pacientes con AAA. En trabajos previos han descrito otras adipocinas como la adiponectina que se encuentra aumentada en el suero de pacientes con AAA y este incremento presentaba una correlación con el diámetro aneurismático de 3 a 5cm Golledge, J., 2007).

Por otro lado se ha sugerido que RBP-4 puede ser un mediador de resistencia a insulina, siendo la diabetes es un factor protector en el desarrollo del AAA y que la hiperglucemia se ha demostrado que es un factor protector en modelos animales a los que se les provoca AAA y que el tratamiento con insulina disminuye el efecto protector (Miyama, N., 2010). La expresión transgénica o inyecciones de RBP-4 provoca resistencia a la insulina en ratones, mientras que la resistencia disminuye al reducirse los niveles de RBP-4 en ratones con dieta grasa (Broch, M., 2007). Se encontró que la sobreexpresión transgénica de RBP-4 humana y la inyección de RBP-4 recombinante disminuye la sensibilidad a la insulina en ratones normales, y la delección del gen RBP-4 o normalización de las concentraciones de RBP-4 en ratones obesos mejora de sensibilidad a la insulina (von Eynatten, M., 2009). El aumento de los niveles de RBP-4 en pacientes con AAA de pequeño diámetro podría reflejarse como una respuesta temprana al daño, asociada a procesos inmunoinflamatorios.

Tabla 1. Proteínas diferenciales identificadas en el plasma de pacientes con AAA y sujetos controles por 2D-DIGE.

DeCyder (Av.Ratio/t-Test) †					Mascot **			PM(KDa)/pI	Péptidos	coincidencia	
punto *	Ctrl vs aaa	Ctrl vs AAA	aaa vs AAA	proteína #	Código NCBI §	Total	Esperados	iones	Teórico. ††	macheados ##	(%) § §
1	1.85/3.11E-02	2.18/1.73E-02	-	ceruloplasmin	gi 1620909	194	3.7E-13	82	11.6/5.43	8	10
2	-	-1.5/1.97E-02	-	plasminogen	gi 4505881	736	2.4E-67	368	93.2/7.04	28	45
3	-	1.96/4.10E-02	-	C4A protein	gi 148922168	304	3.9E-24	114	18.9/6.7	18	12
4	-	1.69/3.73E-02	-	C4A protein	gi 148922168	175	3.1E-08	NA	18.9/6.7	14	10
5	-	1.67/4.74E-02	-	C3b In Complex With A C3b Specific Fab	gi 224983659	189	1.2E-12	NA	71.4/6.82	12	25
6	1.85/3.86E-02	-	-	Beta-2-glycoprotein I apolipoprotein H	gi 28810	322	5.9E-26	174	39.6/8.34	7	31
7	1.48/4.95E-02	-	-	P14-Fluorescein-N135q-S380c-Antithrombin-Iii	gi 8569387	179	2.8E-13	62	49.4/5.95	7	19
8	1.49/1.77E-02	-	-2.12/6.83E-02	Human Beta-2-Glycoprotein-I	gi 6573461	220	9.4E-16	124	37.5/8.37	5	24
9	-1.54/6.73E-03	-	-	kallistatin	gi 425146	178	1.5E-11	79	48.7/7.33	6	14
10	-	-	-2.52/2.97E-02	alpha-2-HS-glycoprotein, isoform CRA_a	gi 119598593	257	1.9E-19	259	40/5.43	9	26
11	-	-1.8/2.37E-02	-	inter-alpha (globulin) inhibitor H2	gi 55958063	149	1.2E-08	65	10.6/6.56	6	8
12	-	-1.67/6.91E-03	-1.69/7.67E-03	hemopexin precursor	gi 386789	199	1.2E-13	91	52.2/6.57	7	13
13	-	-1.57/1.5E-02	-1.57/1.44E-02	hemopexin precursor	gi 386789	108	3.5E-06	NA	52.2/6.57	7	15
14	-	-1.7/2.2E-02	-1.79/9.43E-03	hemopexin precursor	gi 13529281	317	1.9E-25	156	52.2/6.57	10	25
15	1.86/5.04E-03	-	-	Human Plasma Retinol-Binding Protein (Rbp4)	gi 157830446	118	1.5E-05	52	21.3/5.27	3	23
16	-3.21/4.45E-03	-	-	SP40,40'	gi 338305	184	3.9E-12	62	37/5.74	7	24
17	1.56/4.81E-02	-	-	N-Terminal Laminin G-Like Domain Of Shbg	gi 9256917	121	7.4E-06	58	18.9/5.31	3	25
18	-	-1.57/2.83E-02	-	ACTB protein	gi 15277503	178	3.5E-13	88	40.5/5.55	5	18
19	3.54/9.44E-02	-	-5.37/3.05E-02	ACTB protein	gi 15277503	77	4.5E-03	NA	40.5/5.55	5	18
20	-	-	-2.06/2.57E-02	ceruloplasmin	gi 1620909	107	1.9E-04	71	11.6/5.43	3	3
21	-	1.83/4.48E-02	-	complement factor H-related 1	gi 118442839	208	1.5E-14	105	38.8/7.38	6	21
22	-	-	2.59/1.25E-02	complement Factor H-related Protein 2	gi 1064908	111	7.7E-05	74	28.7/6.52	2	10
23	-1.5/9.48E-03	-	-	Human Complement Component C3	gi 78101267	139	1.2E-07	NA	71.3/6.82	8	18
24	-2.13/3.96E-02	-	-	complement protein H	gi 180473	147	1.9E-08	125	26.7/8.13	1	7
25	-5.63/2.2E-02	-	-	C4B1	gi 40737308	270	9.4E-21	92	48/5.92	10	19
26	2.48/3.25E-02	2.1/3.92E-02	-	inter-alpha (globulin) inhibitor H, isoform CRA_b	gi 119585669	160	2.2E-11	115	101.5/6.21	3	3

27	-	-1.65/5.22E-02	-1.51/4.34E-02	complement component 1, q subcomponent	gi 56205030	100	2.2E-05	85	23.7/9.32	1	4
28	-	-	7.85/4.78E-02	Human C-Reactive Protein	gi 1942435	117	1.9E-05	86	23.1/5.28	2	10
29	-5.63/2.2E-02	-	-	C4B1	gi 40737308	389	1.2E-32	229	48/5.92	9	17
30	-	-2.03/7.44E-02	-2.3/3.89E-02	Retinol-Binding Protein 4 (Rbp4)	gi 222143229	105	3.00E-04	64	25/5.58	2	9
31	-	-	-1.99/7.32E-03	Retinol-Binding Protein 4 (Rbp4)	gi 7770173	86	0.026	67	18.2/4.89	1	7
32	-	-1.97/2.87E-02	-	kininogen 1	gi 4504893	86	0.027	53	48.9/6.29	2	2

* Número del punto.

† Relación del volumen del ratio cuantificado por DeCyder software y p-value mediante t-test (NS: valores no significativos)

Proteína identificada

§ Número de acceso a la base de datos NCBI

** Mascot score. NA: No aplicable.

†† Peso molecular y punto isoeléctrico teórico

Número de péptidos macheados de la proteína secuenciada; número de péptidos no macheados

†† Secuencia coincidente con la proteína

2. Estudio de proteínas en plasma mediante array, identifica IGFBP-1 como nuevo marcador biológico del aneurisma de aorta abdominal.

Anteriormente hemos abordado el estudio proteómico en plasma de pacientes mediante 2D-DIGE siendo el plasma previamente deplecionado mediante una columna de afinidad. El uso de columnas de afinidad, elimina proteínas como albumina, haptoglobina, IgG... etc, pero también puede suponer la pérdida no específica de otras proteínas, que pueden estar implicadas en las vías fisiopatológicas de la enfermedad cardiovascular (Granger, J., 2005). Por lo tanto pensamos que el estudio de citoquinas en el plasma mediante el uso de *arrays* de proteínas, sería una técnica complementaria al análisis proteómico y de esta manera nos permite responder de una forma más completa al objetivo 1 y poder identificar posibles biomarcadores para una mejor inhibición farmacológica del crecimiento y desarrollo del aneurisma. Las citoquinas han sido ampliamente estudiadas en pacientes con AAA, debido a la importancia de la respuesta inmunoinflamatoria en la patogénesis del AAA (Golledge, A.L., 2009). Los *arrays* de proteínas nos proporcionan un análisis mediante el uso específico de anticuerpos frente a las citoquinas que queremos estudiar. En el presente trabajo con el objetivo de identificar nuevos biomarcadores circulantes del AAA, se han analizado 20 citoquinas en el plasma de pacientes de AAA comparando los resultados con un grupo control de sanos.

En el estudio hemos observado niveles elevados de diversas citoquinas entre ellas IGFBP-1 (proteína de unión a IGF-1) en el plasma de pacientes con aneurismas, validando los resultados por ELISA. Posteriormente hemos visto que IGFBP-1 se correlaciona positivamente con el diámetro del AAA. También hemos observado por inmunohistoquímica la presencia de IGFBP-1 en el ILT y la posible degradación de esta proteína en el trombo. Mediante estudios *in vitro* de agregación observamos que IGFBP-1 inhibe la agregación plaquetaria producida por IGF-1 tras activación por ADP a diferentes concentraciones de IGFBP-1. Esta respuesta es similar a la obtenida por otros autores con IGFBP-2 e IGFBP-3 (Marcinkiewicz, M., 2008). El papel de IGFBP-1 en la patogénesis de AAA podría estar relacionado con la modulación del efecto de IGF-1 sobre la agregación plaquetaria (Wheatcroft, S.B., 2009).

Los resultados obtenidos sugieren que el medio proteólico presente en el trombo favorece la disociación de IGFBP-1 lo que favorece la unión del IGF-1 a su receptor en plaquetas aumentando la agregación plaquetaria y la formación del ILT.



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Atherosclerosis

journal homepage: www.elsevier.com/locate/atherosclerosis

Plasma profiling by a protein array approach identifies IGFBP-1 as a novel biomarker of abdominal aortic aneurysm

P. Ramos-Mozo^a, C. Rodriguez^c, C. Pastor-Vargas^b, L.M. Blanco-Colio^a, J. Martinez-Gonzalez^c, O. Meilhac^e, J-B Michel^e, M. Vega de Ceniga^d, J. Egido^a, J.L. Martin-Ventura^{a,*}

^a Vascular Research Lab, Diaz-Autonomia University, Madrid, Spain

^b Immunology Lab, IIS-Fundación Jiménez, Diaz-Autonomia University, Madrid, Spain

^c Centro de Investigación Cardiovascular, Consejo Superior de Investigaciones Científicas-Institut Català de Ciències Cardiovasculars, IIB-Sant Pau, Barcelona, Spain

^d Vascular Surgery, Hospital Galdakao-Usansolo, Bilbao, Spain

^e INSERM U698, Univ Paris 7, CHU X-Bichat, Paris, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 19 August 2011

Received in revised form 4 January 2012

Accepted 4 January 2012

Available online 25 January 2012

Keywords:

Biomarkers

Platelets

Thrombosis

Abdominal aortic aneurysm

ABSTRACT

Objective: Cytokines are important mediators of immune-inflammatory responses implicated in abdominal aortic aneurysm (AAA) pathogenesis. Our objective was to investigate the cytokine expression profile in plasma of AAA patients.

Methods: Cytokine protein expression was measured in plasma of 5 large AAA patients (aortic size >50 mm) and 5 controls (aortic size <30 mm) using a 20-cytokine antibody-based protein array. IGFBP-1 plasma concentrations were analyzed by ELISA. IGFBP-1 protein levels were analyzed in AAA thrombus by immunohistochemistry and Western blot. Platelet aggregation was assessed by conventional optical aggregometry.

Results: Several proteins including MIP-3α (CCL20), Eotaxin-2 and IGFBP-1 were increased in AAA patients compared to controls. Among them, IGFBP-1 concentrations were significantly higher in large AAA patients vs control subjects. These data were validated in plasma of patients with large AAA ($n = 30$) compared to matched controls ($n = 30$) [834(469–1628) vs 497(204–893) pg/ml, $p < 0.01$]. Furthermore, the potential association of IGFBP-1 with AAA size was analyzed in a second independent group of subjects [large AAA ($n = 59$), small AAA patients (aortic size = 30–50 mm, $n = 54$) and controls ($n = 30$)]. Interestingly, IGFBP-1 levels correlated with AAA size ($r = 0.4$, $p < 0.001$), which remained significant after adjusting for traditional risk factors. IGFBP-1 was localized in the luminal part of AAA thrombus and IGFBP-1 levels were increased in AAA thrombus conditioned media compared to media layer and healthy media. Interestingly, IGFBP-1 abrogated the potentiation of ADP-induced platelet aggregation triggered by IGF-1.

Conclusions: IGFBP-1 has been identified by a protein array approach as a potential novel biomarker of AAA. The biological role of IGFBP-1 in AAA pathogenesis could be related to the modulation on the effect of IGF-1 on platelet aggregation.

© 2012 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Abdominal aortic aneurysm (AAA) is an important health problem, which occurs in up to 9% of adults older than 65 years of age. The incidence of asymptomatic and ruptured AAA has increased during the last decades, causing about 1–2% of male deaths in Western countries [1].

AAA is a pathological remodeling of the arterial wall, involving intraluminal thrombus (ILT) formation, oxidative stress,

proteolysis, angiogenesis and immuno-inflammatory processes [2]. Although great efforts have been made in the last years to understand the pathogenesis of AAA, there is currently no established treatment for small AAAs [3]. Identification of novel biomarkers could afford novel pathogenic pathways and may thus open possibilities for pharmacological inhibition of growth. Despite several potential biomarkers of AAA have been proposed [4,5], it is essential to discover new biomarkers for early disease detection and risk stratification, which could predict clinical outcome.

Application of proteomics to the study of vascular diseases has resulted in advances in the last years [6,7]. However, the different proteomic technologies used in the last years suffer from a limited dynamic range for protein detection. Analysis of crude plasma or serum does not provide information on thousands of proteins and peptides that are masked by most abundant proteins.

* Corresponding author at: Vascular Research Lab, Fundación Jiménez Díaz, Autónoma University, Av. Reyes Católicos 2, 28040 Madrid, Spain.
Tel.: +34 550 4800x3168; fax: +34 915 448246.

E-mail address: jlmartin@fdj.es (J.L. Martin-Ventura).

Several approaches can be used to eliminate major proteins interfering with proteomic analysis. Abundant proteins can be removed by immuno-affinity columns before proteomic analysis; however, albumin depletion may involve a non-specific loss of other low abundant proteins, which may reflect important pathophysiologic pathways, such as cytokines [8], known to participate in cardiovascular (CV) diseases.

In the pursuit toward a systematic analysis of human diseases, array-based approaches with antibody proteomics offer high-throughput strategies to discover protein biomarkers in plasma [9]. A majority of investigations into the search of plasma biomarkers have been undertaken using 2D electrophoresis or mass spectrometry [10]. While these tools are invaluable for the identification of biomarkers and disease-specific biomolecular patterns, patient diagnosis will be better facilitated by high-throughput, array-based technologies.

Due to the role of immune-inflammation in AAA, cytokines have been widely studied [11]. In a recent study, the profile of cytokines in AAA tissue vs non-AAA tissue has been characterized [12]. In the present paper, we have analyzed the cytokine profile in plasma of patients with AAA by a protein array approach.

2. Materials and methods

2.1. AAA patients and controls

Five plasma samples of large AAA patients (AAA size >50 mm) and 5 samples of controls (aortic size <30 mm) without significant differences in age, sex and AAA risk factors were used for protein array analysis. Validation of IGFBP-1 was performed on 30 plasma samples of large AAA patients and 30 plasma samples of controls (<30 mm, confirmed with abdominal ultrasound) matched by age, sex and AAA risk factors (Table 1). To assess the potential association of IGFBP-1 with AAA size, plasma was obtained from three groups of subjects: (1) 30 male controls (65 years old) with non-dilated infrarenal aortas and no AAA risk factors (hypertension, smoking and previous CV disease), although they have some CV risk factors (dyslipemia = 47%, diabetes = 10%); (2) 54 patients with an asymptomatic infrarenal AAA collected during clinical examination (AAA size = 30–50 mm); (3) 59 patients with an asymptomatic infrarenal AAA collected before surgical repair (AAA size >50 mm, $n = 59$). The aortic size of controls (<30 mm) was confirmed with abdominal ultrasound. All the AAA were assessed with at least one abdomino-pelvic contrast CT scan, where we could evaluate and measure the complete length of the abdominal aorta on the iliac axis. The 3–3.9 cm AAA were followed with annual ultrasound scans and the 4–4.9 cm AAA were followed with 6-month CT scans. We excluded popliteal aneurysms by physical examination. If any popliteal pulse was found to be bounding we confirmed or discarded an aneurysm with an ultrasound examination; but popliteal ultrasound scans were not performed routinely. We did not routinely add a thoracic CT scan either, unless we found an enlarged aorta in its visceral or thoracoabdominal segment. These patients with more extensive than just infrarenal disease were excluded from the present study anyway. We also excluded patients with a

history or findings on examination of any acute or chronic inflammatory disease, as we did with those with CRP >15 mg/L. Patient selection and analysis performed is summarized in Table 1 Online.

Fasting venous blood samples were collected into tubes containing EDTA. The samples tubes were centrifuged for 20 min at 2500 rpm. After, the plasma were immediately stored at -80°C . The study was approved by Spanish Center's Research and Ethics Committees, and informed consent from the patients and the controls for their inclusion in the study was obtained. The investigation conforms with the principles outlined in the Declaration of Helsinki.

2.2. AAA tissue-conditioned media

Ten AAA thrombus and wall samples were collected during surgical repair and dissected into luminal and abluminal parts (at the interface with circulating blood and with the remaining media, respectively). AAA samples were obtained from patients undergoing surgery, enrolled in the RESAA protocol (REflet Sanguin de l'évolutivité des Anévrismes de l'Aorte abdominale, CCPPRB Paris-Cochin n° 2095, n° 1930 and n° 1931) [13]. All patients gave their informed written consent, and the protocol was approved by a French ethics committee (CCPPRB, Cochin Hospital). Ten control aortas were sampled from dead organ donors with the authorization of the French Biomedicine Agency (PFS 09-007). These control aortic samples were macroscopically normal, devoid of early atheromatous lesions. Different layers of AAA thrombus and wall, as well as healthy walls, were cut into small pieces (5 mm^2) and separately incubated in RPMI 1640 medium containing antibiotics and an antimycotic (Gibco) for 24 h at 37°C (6 ml/g of wet tissue). The conditioned medium (supernatant containing proteins released by the tissue sample) was obtained after centrifugation as $3000 \times g$ for 10 min at 20°C .

2.3. Protein array

We performed a 1:2 dilution of plasma samples since this was the condition for which a higher number of cytokines could be detected inside the range of the standard curves. Soluble concentrations of 20 cytokines were measured using a protein array following the manufacturer's instructions (Quantibody Human Cytokine Array 2, RayBiotech, Inc.), by which a standard curve and plasma samples were analyzed simultaneously by a method similar to a sandwich-ELISA. Briefly, $50\text{ }\mu\text{L}$ of sample was incubated 1 h at RT with arrayed antibody and then with biotinylated antibodies. Adding Cy3 equivalent dye labeled streptavidin allowed the fluorescence detection. Detection of signals was performed through use of a scanner equipped with Cy3 excitation/emission wavelength (555/565 nm). Microarray analysis software was used to data extraction, as well as for quantitative data analysis.

2.4. ELISA

Plasma concentrations of insulin-like growth factor binding protein-1 (IGFBP-1) (IGF-BP1 ELISA Kit, RayBiotech, Inc.), C-reactive protein (CRP, R&D) and plasmin-antiplasmin (PAP) complexes (Technoclone) were quantified using commercial kits following the manufacturer's instructions. Alpha 1-antitrypsin (AAT) was measured by immunonephelometric method (Dade Behring, Inc. Deerfield, IL).

2.5. Western blot

Equal amount of protein ($20\text{ }\mu\text{g}$), calculated by Bradford reagent (Biorad), was resolved on denaturing SDS/12% (w/v) polyacrylamide gels. Proteins were then blotted onto PVDF (Immobilion-P; Millipore) membranes and the blots were blocked with 10% (w/v)

Table 1
Clinical data of controls and large AAA patients used for validation.

	Controls ($n = 30$)	Large AAA patients ($n = 30$)
Age (years, mean \pm SD)	67 \pm 5	69 \pm 5
Gender (male, %)	97	100
Smoking (%)	40	56
Hypertension (%)	63	50
Diabetes mellitus (%)	16	10
Dyslipemia (%)	53	30
Heart disease (%)	30	23

non-fat dry milk in TBST (0.01 M Tris (pH 7.7), 0.1 M NaCl and 0.1% Tween 20). The membranes were incubated with a monoclonal antibody against IGFBP-1 (Ab10732; Abcam). After they were incubated with HRP (horseradish peroxidase)-conjugated anti-mouse IgG antibody at a dilution of 1:2500. The proteins were then detected by enhanced chemiluminescence (ECL Western Blotting Detection Reagents, Amersham Biosciences) and evaluated by densitometry (Quantity One; Bio-Rad Laboratories). Pre-stained protein markers (PageRuler™ Prestained Protein Ladder; Fermentas) were used for molecular mass determinations.

2.6. Immunohistochemistry

AAA thrombus samples were fixed in 3.7% paraformaldehyde and embedded in paraffin. Immunohistochemistry was performed on 5 μ m sections, using IGFBP-1 (5 μ g/mL, Ab10732) as primary antibody. Negative controls using the corresponding IgG were included for checking non-specific staining. The secondary antibody and ABCComplex/HRP were added and sections were stained with 3,30-diaminobenzidine and mounted in DPX.

2.7. Platelet aggregometry

Human blood from healthy volunteers was collected into sodium citrate (0.16 mol/L). Platelet rich plasma (PRP) was prepared from citrated blood by centrifugation at $200 \times g$ for 15 min at room temperature. Platelet aggregation was assessed in PRP by conventional optical aggregometry (Aggrecorder-II, Menarini Diagnostics, Italy) under stirring conditions (1000 rpm) using ADP (Aggpack, Arkray Factory Inc.) as an agonist [14]. PRP was pretreated (37 °C for 5 min) with vehicle (saline), human IGF-1 (Bio-Vision), human IGFBP-1 (Hytest Ltd.) or their combination and their effect on ADP-induced platelet aggregation was monitored.

2.8. Statistical analysis

In vitro results are expressed as mean \pm standard error. The Wilcoxon paired test was used to analyze differences in IGFBP-1 levels between thrombus and pathological media supernatants of the same subjects. The analysis between pathological media vs healthy tissue conditioned-media was performed with non-parametric test. IGFBP-1 levels in AAA patients and controls are expressed as median (interquartile ranges, IQR) and were analyzed by the Mann–Whitney *U* test. Univariate association was performed by Spearman correlation test. Multivariate linear regression analysis was conducted with AAA size as dependent variable, including in the model the traditional risk factors. The statistical analysis was performed using the SPSS 15.0 software and $p < 0.05$ as significant.

3. Experimental results

3.1. Exploratory cytokine protein array in AAA plasma

We performed a protein array with plasma of 5 AAA patients and 5 controls and we have observed that some of the cytokines displayed very high concentrations (e.g. Adiponectin, IGFBP-2, VCAM-1, L-selectin, not shown) whereas other cytokines were undetectable (e.g. B-NGF, IL-7, IL-17) (Fig. 1A). Most of the cytokines were increased in plasma of AAAs vs healthy subjects (BLC = 49 ± 15 vs 25 ± 2 ; EOTAXIN-2 = 410 ± 145 vs 144 ± 52 ; MIP3a = 6 ± 1 vs 4 ± 1 pg/ml, $p = 0.1$ for all of them), although showing a non-significant trend, probably due to the low number of samples. Interestingly, 2 proteins were significantly higher in AAA plasmas

compared to controls (GDNF = 52 ± 7 vs 34 ± 2 , $p = 0.02$; IGFBP-1 = 3412 ± 680 vs 578 ± 75 pg/ml, $p = 0.009$, Fig. 1B).

3.2. Validation of IGFBP-1 in AAA patients

We selected IGFBP-1 for further validation since it showed the highest statistical difference between patients and controls. We performed a pilot study to analyze IGFBP-1 levels in plasma of controls (AAA diameter < 30 mm, $n = 30$) and large AAA patients (AAA size > 50 mm, $n = 30$) matched by age, sex and AAA risk factors. Confirming the array results, IGFBP-1 concentrations were higher in plasma of large AAA patients compared to control subjects [$834(469–1628)$ vs $497(204–893)$ pg/ml, $p < 0.01$] (Fig. 2A). CRP and white blood cell count (WBC) were measured in these patients and both CRP concentration and WBC count were higher in AAA patients compared to controls, although it did not reach statistical significance [$4.2(1.9–6.01)$ vs $2.7(1.5–6.2)$ mg/L; $7.7(6.6–8.3)$ vs $6.3(5.8–6.7) \times 10^3$ /ml, $p = \text{ns}$, not shown]. No correlation between IGFBP-1 and CRP or WBC was observed ($r = -0.04$ and $r = 0.08$, $p = \text{ns}$).

In order to evaluate a potential biological meaning of increased IGFBP-1 in large AAA patients, we analyzed its potential association with AAA size and with markers of thrombus activity [e.g. plasmin–antiplasmin complexes (PAP) and alpha-1-antitrypsin (AAT)] in a second independent group of subjects [large AAA ($n = 59$), small AAA patients (AAA size = $30–50$ mm, $n = 54$) (Table 2) and control subjects (AAA size < 30 mm, $n = 30$)]. Interestingly, IGFBP-1 levels correlated with AAA size ($n = 143$, $r = 0.4$, $p < 0.001$, Fig. 2B), which remained significant after adjustment for sex, age, dyslipidemia, current smoking, arterial hypertension and heart disease (Table 2 Online). Furthermore, IGFBP-1 concentrations correlated with PAP and AAT in plasma (0.35 and 0.3 respectively, $p < 0.05$ for both of them).

3.3. IGFBP-1 in AAA tissue-conditioned media

We have analyzed the levels of IGFBP-1 in both AAA thrombus conditioned medium and arterial wall, as well as in healthy aortic media layer. IGFBP-1 levels were increased in the conditioned medium ILT of AAA relative to that obtained from the media layer (18.4 ± 4.1 vs 8.4 ± 1.9 a.u., $p < 0.05$, Fig. 3A). Interestingly, bands of lower molecular weight probably corresponding to proteolytic fragments of IGFBP-1 were observed only in the thrombus-conditioned medium (lower arrows). Finally, IGFBP-1 levels were increased in pathological compared to healthy aortic media (8.4 ± 1.9 vs 1.9 ± 0.3 a.u., $p < 0.05$, Fig. 3A). Detection of IGFBP-1 in AAA samples was achieved by immunohistochemistry (Fig. 3B). Positive staining was observed in the luminal part of the thrombus, associated with polynuclear cells (probably neutrophils). A diffuse staining was also observed in the fibrin network suggesting that circulating IGFBP-1 could be, at least partially, trapped by the thrombus.

Table 2
Clinical data of AAA patients used for correlation with aortic size.

	Small AAA patients ($n = 54$)	Large AAA patients ($n = 59$)
Age (years, mean \pm SD)	73 ± 8	70 ± 8
Gender (male, %)	92	97
Smoking (%)	53	52
Hypertension (%)	65	50
Diabetes mellitus (%)	25	20
Dyslipidemia (%)	63	60
Heart disease (%)	26	25

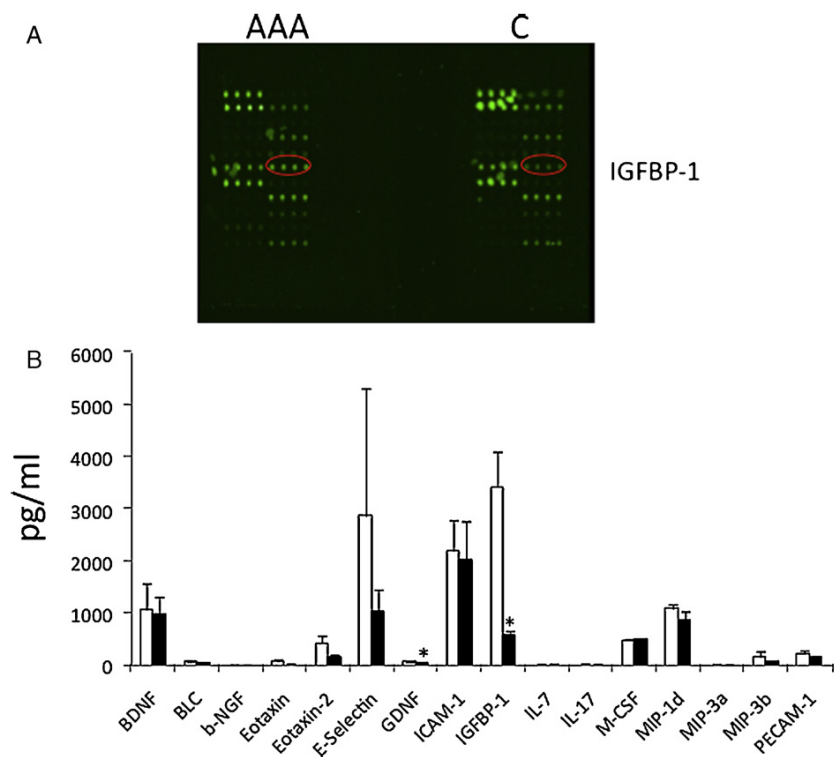


Fig. 1. Cytokine array of plasma from AAA patients and controls. (A) Slides were scanned using a GenePix 4000A microarray scanner and image analysis was performed with GenePix Pro software (version 6.0). (B) Quantification of cytokines in plasma of AAA patients (white) and controls (black). * $p < 0.05$ vs controls. BDNF, brain-derived neurotrophic factor; BLC, B lymphocyte chemoattractant; b-NGF, nerve growth factor beta; GDNF, glial cell-derived neurotrophic factor.

3.4. IGFBP-1 prevents the potentiating effect of IGF-1 on platelet aggregation

To understand the potential role of tissue IGFBP-1 in AAA pathogenesis, we analyzed the potential modulatory role of IGFBP-1 on the effect of IGF-1 on platelet aggregation. As previously described, IGF-1 alone (13–100 nM) was unable to induce platelet aggregation,

but enhanced that promoted by a concentration of ADP that elicits a submaximal aggregation response ($48.75 \pm 3.14\%$ at $1 \mu\text{M}$ ADP) [15]. Neither IGFBP-1 (13–100 nM) alone nor combined with ADP had a significant effect on platelet aggregation. However, IGFBP-1 prevented the potentiation of ADP-induced platelet aggregation exerted by IGF-1 (26 nM) in a dose-dependent manner. Used at an equimolar concentration IGFBP-1 partially suppressed the effect of

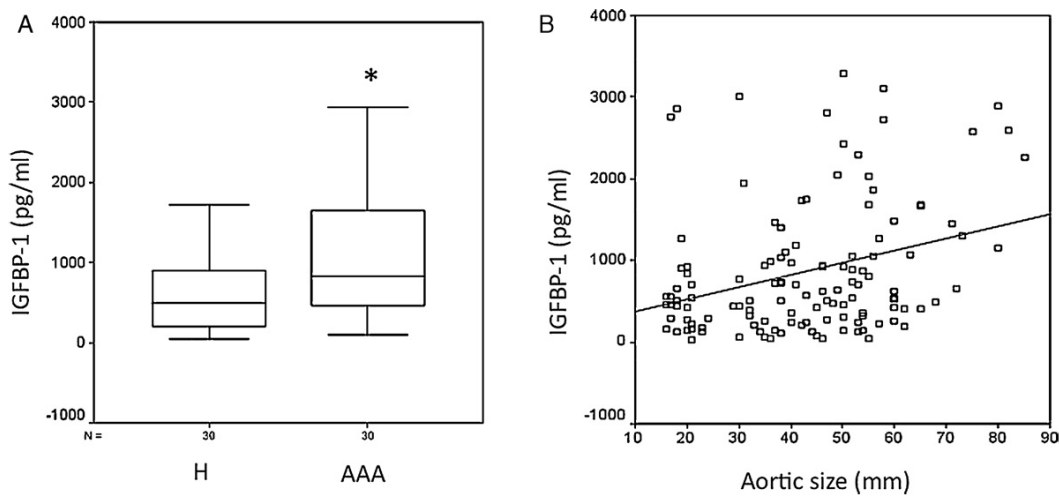


Fig. 2. Validation of IGFBP-1 plasma levels and correlation with aortic size. (A) ELISA of IGFBP-1 in controls ($n = 30$) and large AAA ($n = 30$), * $p < 0.01$ vs controls. (B) IGFBP-1 levels correlate with aortic diameter ($\rho = 0.4$; $p < 0.001$, $n = 143$).

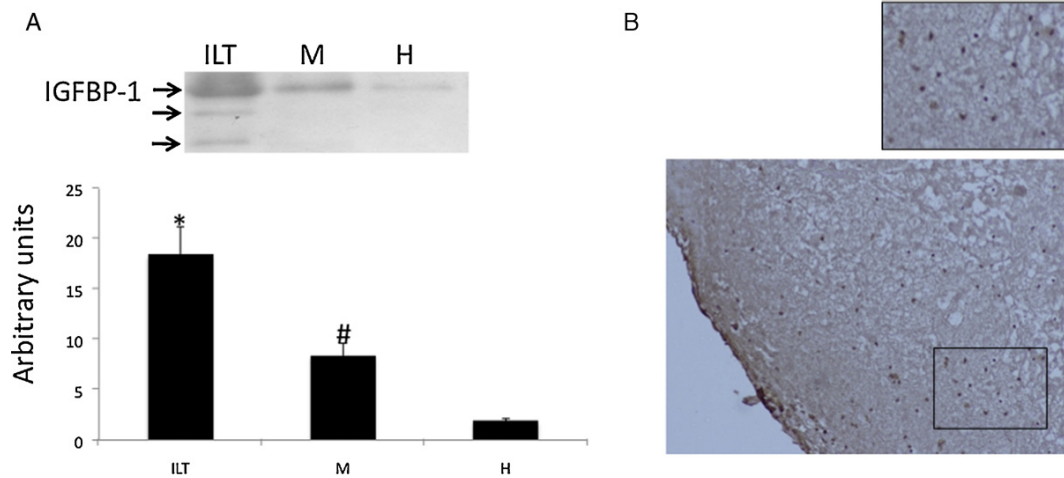


Fig. 3. IGFBP-1 in AAA thrombus and thrombus-conditioned media. (A) Western blot and quantification of IGFBP-1 levels in thrombus (ILT) and wall (M) of AAA ($n = 10$), as well as in healthy media (H, $n = 10$). * $p < 0.05$ ILT vs M and # M vs H. (B) Immunohistochemistry of IGFBP-1 in AAA thrombus.

IGF-1 on platelet aggregation, while at higher IGF-1:IGFBP-1 molar ratios (1:2, 1:5) markedly abolished the pro-aggregating effect of IGF-1 (Fig. 4).

4. Discussion

Previous papers have analyzed the levels of cytokines in AAA [11,12] due to the importance of immune-inflammatory responses in AAA pathogenesis. New approaches to quantitatively study low-abundance proteins (such as cytokines) and their functional analysis into specific protein networks will be of crucial importance in the post-genomic era [6]. Several high-throughput multiplexed techniques have been recently developed to assess protein expression at a functional level. Array-based techniques offer the potential for analysis of entire protein networks (i.e. apoptosis, inflammation, signaling pathways) through the use of specific antibodies. In the present paper, with the aim to identify novel circulating biomarkers of AAA, we have analyzed 20 proteins in AAA plasma by an antibody array approach. However, some of these circulating proteins displayed very high concentrations or undetectable levels. In this regard, the wide range of concentrations of plasma proteins represent a limitation to the use of protein arrays for high-throughput analysis. For the rest of the proteins, most of them were

overexpressed in AAAs plasma, such as eotaxin, which has been previously associated to different mechanisms involved in AAA pathogenesis such as matrix metalloproteinase (MMP) induction [16].

Among proteins with higher levels in AAA patients, we have focused our attention on IGFBP-1 due to the high significant differences observed between AAA patients and controls in our array study. This initial data was further verified in plasma samples of large AAA patients and controls matched by age, sex and risk factors, confirming the increased IGFBP-1 concentrations in plasma from large AAA patients. Accumulating evidence indicates important roles for IGFBP-1 in metabolic homeostasis. In this respect, metabolic syndrome has emerged as an independent predictor of CV events in patients with either occlusive or aneurysmatic peripheral arterial disease [17]. In the present study, we did not find differences in IGFBP-1 concentrations in relation to components of the metabolic syndrome (not shown). Metabolic syndrome has been mainly associated to insulin resistance, although more recently, the presence of abdominal obesity has been defined as the main mechanism underlying this pathological condition. In conjunction with insulin resistance and obesity, dyslipemia is also involved, favoring all of them a chronic immune-inflammatory response in which cytokines, chemokines and adipokines are

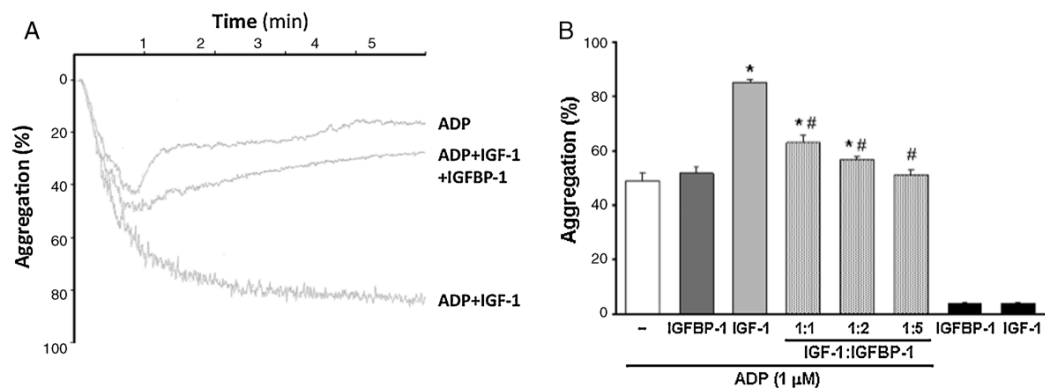


Fig. 4. Effect of IGFBP-1 in platelet aggregation induced by ADP and IGF-1. PRP was preincubated with vehicle (saline), IGF-1 (26 nM), IGFBP-1 or their combination (molar ratios are indicated) at 37 °C for 5 min prior ADP stimulation (1 μ M) and platelet aggregation was monitored by conventional optical aggregometry. (A) Representative platelet aggregation assay analyzing the effect of IGF-1 or IGF-1 plus IGFBP-1 pretreatment on ADP-induced platelet aggregation. (B) The percentage of maximal platelet aggregation was quantified for each experimental condition. Results are expressed as mean \pm SE ($n = 3$; $p < 0.05$: * vs ADP; # vs IGF-1 + ADP).

involved. Thus, high IGFBP-1 levels in AAA could be related to increase inflammatory cytokines observed in AAA, among them TNF- α and IFN- γ [11]. In this respect, TNF- α increased IGFBP-1 and this response was associated with an increase in IGFBP-1 mRNA expression in both liver and kidney [18]. In our study, CRP concentrations and WBC were higher in AAA patients compared to controls, although it did not reach statistical significance. Further studies in larger patient cohorts will be needed to address whether IGFBP-1 could be an independent marker of AAA or represent a surrogate marker of ongoing inflammatory processes.

To address the potential biological meaning of increased IGFBP-1 concentrations in AAA patients, we analyzed its potential association with AAA size and with markers of thrombus activity [e.g. plasmin–antiplasmin complexes (PAP) and alpha-1-antitrypsin (AAT)]. Since AAA diameter is a surrogate marker of AAA growth rate and is the clinical parameter used to the management of AAA patients, we studied its potential correlation with IGFBP-1. Interestingly, we have shown a positive correlation between IGFBP-1 and aortic size, which remain significant after analysis for traditional risk factors. It is important to remember that infrarenal aortic diameter is an indicator of AAA disease, but is also an independent marker of all-cause mortality, mainly related to CV disease [19]. Interestingly, IGFBP-1 shows a positive correlation with PAP and AAT, which are also increased in AAA plasma [20,21]. In a previous study, an increase in IGFBP-1 levels in AAA tissue compared to control aorta was described, whereas IGF-1 show the opposite trend [22]. In agreement, we have shown increased levels of IGFBP-1 in conditioned media of AAA wall compared to healthy aortic wall. However, IGFBP-1 is also present in the AAA thrombus associated with polymorphonucleated cells, probably neutrophils, reported to accumulate in the luminal part of the thrombus [2]. In fact, higher IGFBP-1 levels were detected in AAA thrombus conditioned media, which could also reflect increased retention from the plasma of AAA patients. Interestingly, proteolytic fragments of IGFBP-1 were observed in the thrombus conditioned media. Indeed, several proteolytic enzymes known to be highly expressed in AAA thrombus, such as plasmin, elastase and/or metalloproteinases are known to cleave IGFBP [23,24]. The colocalization between neutrophils and IGFBP-1 in AAA samples makes possible *in vivo* the cleavage of this protein. Since IGFBP-1 was positively correlated with PAP and AAT plasma levels, it could be hypothesized that increased IGFBP-1 circulating concentrations observed in AAA patients could be in part related to increased release from IGF-1 complexes due to high PAP [20] and elastase [21] levels reported in AAA patients. Thus, IGFBP-1 plasma levels could be a surrogate marker of thrombus proteolytic activity.

To finally assess the potential role of IGFBP-1 in AAA pathogenesis, *in vitro* experiments were performed. In this respect, both IGF-dependent and -independent actions of IGFBP-1 has been described. Among IGF-independent actions of IGFBP-1, IGFBP-1 has direct effects on cell growth, differentiation and apoptosis [25]. IGFBP-1 (and possibly IGFBP-2) binds to $\alpha 5\beta 1$ integrin, which could lead to cross talk with other growth control-signaling pathways. *In vitro*, IGFBP-1 inhibits SMC proliferation, although it was not able to reduce neointimal response to balloon catheter injury *in vivo* [26]. However, most IGFBP-1 actions are associated to its modulatory function over IGF-1 [25]. IGFBP-1 acted in an inhibitory manner on IGF-1-induced DNA synthesis [27]. It has been previously shown that IGF-1 can modulate platelet aggregation and IGF receptor has been demonstrated on the platelet surface [15]. Moreover, IGF-1 is released from platelets upon activation [28]. Interestingly, IGFBP-1 is rapidly induced in liver associated to increase platelet number after thrombocytotic mice [29]. In the present study, IGFBP-1 prevented the potentiation of ADP-induced platelet aggregation exerted by IGF-1 in a dose-dependent manner. This response is similar to that triggered by IGFBP-2 and -3, although higher

amounts of both proteins were required to effectively abrogate the pro-aggregating response of IGF-1 [30]. Our results could suggest that the proteolytic environment of AAA thrombus would favor the dissociation of IGFBP-1 from IGF-1 complexes increasing the availability of IGF-1 to IGF-1 receptor in platelets, which could enhance platelet aggregation and promote thrombus formation.

In conclusion, increased IGFBP-1 levels have been observed in plasma of large AAA patients by a protein array approach. Furthermore, IGFBP-1 levels have been associated to AAA size. Finally, the role of IGFBP-1 in AAA pathogenesis could be related to the modulation on the effect of IGF-1 on platelet aggregation.

Acknowledgements

This work was supported by the Ministerio de Sanidad y Consumo, Instituto de Salud Carlos III, Redes RECAVA (RD06/0014/0035 and RD06/0014/0027) and EUS2008-03565, the Spanish MICIN (SAF 2010-21852), Basque Government (n° exp. 2008111019) and the EC, FAD project (FP-7, HEALTH F2-2008-200647).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at [doi:10.1016/j.atherosclerosis.2012.01.009](https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2012.01.009).

References

- [1] Sakalihasan N, Limet R, Defawe OD. Abdominal aortic aneurysm. *Lancet* 2005;365:1577–89.
- [2] Michel JB, Martin-Ventura JL, Egido J, et al. Novel aspects of the pathogenesis of aneurysms of the abdominal aorta in humans. *Cardiovasc Res* 2011;90:18–27.
- [3] Baxter BT, Terrin MC, Dalman RL. Medical management of small abdominal aortic aneurysms. *Circulation* 2008;117:1883–9.
- [4] Urbanavicius S, Urbanaviciene G, Honore B, Henneberg EW, Vorum H, Lindholt JS. Potential circulating biomarkers for abdominal aortic aneurysm expansion and rupture—a systematic review. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2008;36:273–80.
- [5] Golledge J, Tsao PS, Dalman RL, Norman PE. Circulating markers of abdominal aortic aneurysm presence and progression. *Circulation* 2008;118:2382–92.
- [6] Blanco-Colio LM, Lopez JA, Martinez-Pinna R, Egido J, Martin-Ventura JL. Vascular proteomics, a translational approach: from traditional to novel proteomic techniques. *Expert Rev Proteomics* 2009;6:461–4.
- [7] Nordon I, Brar R, Hinchliffe R, Cockerill G, Loftus I, Thompson M. The role of proteomic research in vascular disease. *J Vasc Surg* 2009;49:1602–12.
- [8] Granger J, Siddiqui J, Copeland S, Remick D. Albumin depletion of human plasma also removes low abundance proteins including the cytokines. *Proteomics* 2005;5:4713–8.
- [9] Schwenk JM, Igel U, Kato BS, et al. Comparative protein profiling of serum and plasma using an antibody suspension bead array approach. *Proteomics* 2010;10:532–40.
- [10] Martinez-Pinna R, Barbas C, Blanco-Colio LM, et al. Proteomic and metabolomic profiles in atherothrombotic vascular disease. *Curr Atheroscler Rep* 2010;12:202–8.
- [11] Golledge AL, Walker P, Norman PE, Golledge J. A systematic review of studies examining inflammation associated cytokines in human abdominal aortic aneurysm samples. *Dis Markers* 2009;26:181–8.
- [12] Golledge J, Clancy P, Moran C, et al. The novel association of the chemokine CCL22 with abdominal aortic aneurysm. *Am J Pathol* 2010;176:2098–106.
- [13] Caligiuri G, Rossignol P, Julia P, et al. Reduced immunoregulatory CD31+ T cells in patients with atherosclerotic abdominal aortic aneurysm. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006;26:618–23.
- [14] Badimon L, Martínez-González J, Royo T, Lassila R, Badimon JJ. A sudden increase in plasma epinephrine levels transiently enhances platelet deposition on severely damaged arterial wall. *Thromb Haemost* 1999;82:1736–42.
- [15] Motani AS, Anggård EE, Ferns GA. Recombinant insulin-like growth factor-1 modulates aggregation in human platelets via extracellular calcium. *Life Sci* 1996;58:PL269–74.
- [16] Kodali R, Hajjou M, Berman AB, et al. Chemokines induce matrix metalloproteinase-2 through activation of epidermal growth factor receptor in arterial smooth muscle cells. *Cardiovasc Res* 2006;69:706–15.
- [17] van Kuijk JP, Flu WJ, Chonchol M, Bax JJ, Verhagen HJ, Poldermans D. Metabolic syndrome is an independent predictor of cardiovascular events in high-risk patients with occlusive and aneurysmatic peripheral arterial disease. *Atherosclerosis* 2010;210:596–601.
- [18] Lang CH, Nystrom GJ, Frost RA. Tissue-specific regulation of IGF-I and IGF-binding proteins in response to TNF α . *Growth Horm IGF Res* 2001;11:250–60.
- [19] Norman P, Le M, Pearce C, Jamrozik K. Infrarenal aortic diameter predicts all-cause mortality. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24:1278–82.

- [20] Houard X, Rouzet F, Touat Z, et al. Topology of the fibrinolytic system within the mural thrombus of human abdominal aortic aneurysms. *J Pathol* 2007;212:20–8.
- [21] Houard X, Touat Z, Ollivier V, et al. Mediators of neutrophil recruitment in human abdominal aortic aneurysms. *Cardiovasc Res* 2009;82:532–41.
- [22] Panek B, Gacko M, Pałka J. Metalloproteinases, insulin-like growth factor-I and its binding proteins in aortic aneurysm. *Int J Exp Pathol* 2004;85:159–64.
- [23] Gibson TL, Cohen P. Inflammation-related neutrophil proteases, cathepsin G and elastase, function as insulin-like growth factor binding protein proteases. *Growth Horm IGF Res* 1999;9:241–53.
- [24] Mañes S, Mira E, Barbacid MM, et al. Identification of insulin-like growth factor-binding protein-1 as a potential physiological substrate for human stromelysin-3. *J Biol Chem* 1997;272:25706–12.
- [25] Wheatcroft SB, Kearney MT. IGF-dependent and IGF-independent actions of IGF-binding protein-1 and -2: implications for metabolic homeostasis. *Trends Endocrinol Metab* 2009;20:153–62.
- [26] Motani A, Rutherford C, Anggard EE, Ferns GA. Insulin-like growth factor binding protein-1 inhibits arterial smooth muscle cell proliferation in vitro but does not reduce the neointimal response to balloon catheter injury. *Atherosclerosis* 1995;118:57–66.
- [27] Gustafsson T, Andersson P, Arnqvist HJ. Different inhibitory actions of IGFBP-1, -2 and -4 on IGF-I effects in vascular smooth muscle cells. *J Endocrinol* 1999;161:245–53.
- [28] Karye KP, Sirbasku DA. Human platelet-derived mitogens, II: subcellular localization of insulin like growth factor I to the alpha-granule and release in response to thrombin. *Blood* 1989;74:1093–100.
- [29] Myronovych A, Murata S, Chiba M, et al. Role of platelets on liver regeneration after 90% hepatectomy in mice. *J Hepatol* 2008;49:363–72.
- [30] Marcinkiewicz M, Gordon PV. A role for plasmin in platelet aggregation: differential regulation of IGF release from IGF-IGFBP complexes? *Growth Horm IGF Res* 2008;18:325–34.

3. Análisis proteómico de plaquetas mediante 2D-DIGE

La activación plaquetaria es una característica común en la enfermedad aterotrombótica, ya que la lesión va acompañada de un aumento en la agregación plaquetaria, interacción plaquetas-monocitos y producción de ROS. Las plaquetas activadas liberan ROS al medio extracelular (Stokes, K.Y., 2007), favoreciendo el reclutamiento de otras plaquetas y por consiguiente la formación del trombo (Krotz, F., 2002). Debido al papel que tienen las plaquetas en el trombo, decidimos estudiar este tipo celular para la búsqueda de proteínas potencialmente diferenciales entre pacientes con aneurisma comparado con un grupo de controles sanos que tienen edad, sexo y factores de riesgo similares al grupo de pacientes.

3.1. Materiales y Métodos:

3.1.1. Aislamiento de las Plaquetas:

Las plaquetas fueron obtenidas a partir de sangre periférica que fue recogida en tubos con EDTA. Mediante la centrifugación a 1000 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente, obtuvimos el plasma rico en plaquetas (PRP). El PRP se centrifugó a 3500 rpm durante 10 minutos y el pellet fue resuspendido en buffer de lisis [urea 7M, tiourea 2M, CHAPS 4%, Tris 30mM (pH 8.5)]. Posteriormente se analizó la concentración de proteína obtenida mediante el método colorimétrico Bradford (Thermo Scientific).

3.1.2. Aislamiento del plasma:

El plasma se obtuvo de sangre periférica que fue recogida en tubos EDTA y centrifugada a 2500 rpm durante 15 minutos a temperatura ambiente.

3.1.3. 2D-DIGE:

Para el análisis proteómico se usaron los extractos proteicos de plaquetas de 4 pacientes con aneurisma de diámetro superior a 5cm, 4 con diámetro entre 3-5cm y otros 4 voluntarios sanos.

Se llevó a cabo la precipitación de las proteínas plaquetarias mediante el kit 2D clean-up (GE-Healthcare). Los pellet obtenidos tras esta precipitación fueron resuspendidos en buffer de lisis [urea 7M, tiourea 2M, CHAPS 4%, Tris 30mM (pH 8.5)]. La cuantificación de proteínas se realizó mediante el método colorimétrico RC-DC de Biorad.

Las muestras fueron marcadas siguiendo las instrucciones del kit (*CyDye Fluor minimal dyes*, GE Healthcare), usando 400 pmol de fluoróforo para 50ug de proteína obtenida. Los seis pares de muestras fueron marcados con fluoróforos Cy3 y Cy5 según se describe en las instrucciones. El estándar o patrón interno marcado con Cy2. La reacción se realizó en hielo y oscuridad durante 30 minutos, después se añadía 1ul de lisina 10mM durante 10 minutos para detener la reacción. Las mezclas fueron diluidas en buffer de

rehidratación (7 M urea, 2 M tiourea, 4% w/v CHAPS, 0.8% IPG Buffer 3-11NL y azul de bromofenol) con 50 mM DTT.

Para la primera dimensión las muestras cargadas mediante la técnica “*cup loading*” en tiras de agarosa de 24cm con IPG de 3-11 previamente rehidratadas con 450ul de buffer de rehidratación que contenía DeStrak 97mM (GE Healthcare). Se realizó la separación por punto isoeléctrico usando el sistema Protean IEF de Biorad hasta un total de 60kVh. Después las tiras fueron equilibradas en buffer de equilibrado que contiene urea 6 M, glicerol 30%, SDS 2% y azul de bromofenol, durante 15 minutos con un 1% DTT y 15 minutos con el mismo buffer sin DTT y con iodoacetamida al 4%.

Finalmente se realizó la electroforesis en geles SDS-PAGE al 10% de poliacrilamida. Los geles fueron escaneados en el escáner Typhoon 9400 (GE Healthcare) y posteriormente se fijaron las proteínas con metanol al 12% y ácido acético al 7%. Las imágenes fueron analizadas usando el *Decyder software* (versión 7.0, GE Healthcare), para la detección y cuantificación de los *spots* de proteínas. La significación estadística se evaluó según cambios en la abundancia, usando la *t-student* y ANOVA. Los resultados fueron expresados con un 95% de confianza, para diferencias encontradas de al menos 1.5 veces en cuanto a la relación de volúmenes de manchas proteicas.

3.1.4. Identificación de proteínas por MALDI-TOF/TOF:

Se tiñieron los geles con un kit de plata, *Plus One silver staining* (GE Healthcare), para visualizar la proteínas o *spots*. Los *spots* seleccionados de los geles teñidos con plata, fueron extraídos manualmente y digeridos automáticamente con tripsina. Los péptidos resultantes de cada digestión, son ionizados en el espectrómetro mediante un láser para que así puedan volar através del tubo de vuelo hasta llegar al detector. Se obtienen datos combinados de MS y MS/MS, para obtener la huella peptídica de los espectros de fragmentación de los péptidos analizados. Se usaron para la búsqueda de las proteínas candidatas el *software Mascot de Matrix Bioscience*. Las bases de datos empleadas para hacer las búsquedas fueron las del NCBI (Centro Nacional de Información Biotecnológica). Para la búsqueda en estas bases de datos, se eliminaron los picos correspondientes de péptidos procedentes de la autólisis de la tripsina, así como aquellos correspondientes a queratinas y derivados de la matriz.

3.1.5. Western Blot:

Para el análisis por western blot se aislaron plaquetas de 9 pacientes con diámetro del aneurisma superior a 5cm, 9 con tamaño entre 3-5cm y 9 controles sanos con similar edad, sexo, factores de riesgo y medicación a los pacientes. Se cargaron 20ug de proteína en geles SDS-PAGE al 12%. Las proteínas se transfirieron a membranas de PVDF (Immobilion-P; Millipore) y posteriormente fueron bloqueadas durante 1 hora con leche al 10% de TBST1x [0.01 M Tris (pH 7.7), 0.1 M NaCl y 0.1% Tween 20]. Las membranas se incubaron con anticuerpo anti-P-selectina (1:500, Santa Cruz), anti-Apo A1 (anticuerpo frente

Apolipoproteína A1 elaborado en el laboratorio hecho en conejo; 1:50000), anti- β_3 integrina (1:200, Santa Cruz) y anti-gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (1:5000, Millipore), después se añadieron sus correspondientes anticuerpos secundarios HRP (anti-mouse dilución 1:2500 y anti-rabbit 1:5000).

Para el western blot de sobrenadantes se recogieron trombos de pacientes con AAA y se dividieron según sus capas, los tejidos fueron incubados individualmente en medio RPMI (Gibco) suplementado con antibióticos y antimicóticos durante 24 horas a 37° C. Se emplearon 6mL de medio por cada gramo de tejido seco. Pasado el tiempo de incubación se recogió los sobrenadantes y se centrifugaron a 4000 rpm durante 10 minutos. Se cargaron 15ul del medio condicionado de las diferentes capas del ILT en el gel y se realizó una electroforesis en geles SDS-PAGE al 15%, posteriormente las proteínas se transfirieron a membranas de PVDF (Immobilion-P; Millipore) que fueron bloqueadas durante 1 hora con leche al 10% de TBST1x (0.01 M Tris (pH 7.7), 0.1 M NaCl and 0.1% Tween 20). Las membranas se incubaron con anticuerpo frente a Apo A1 (anticuerpo frente Apolipoproteína A1 elaborado en el laboratorio hecho en conejo; 1:50000) durante toda la noche a 4°C. Después fue incubada con su correspondiente anticuerpo secundario HRP (anti-rabbit, dilución 1:5000).

Finalmente las proteínas fueron detectadas con un kit de quimioluminiscencia (ECL Western Blotting Detection Reagents, Amersham Biosciences) y cuantificadas mediante el programa Quantity One (Quantity One; Bio-Rad Laboratories). El análisis estadístico se realizó mediante un estudio de test-pareado. Se usó un marcador de peso molecular para determinar la banda de nuestra proteína (PageRuler™ *Prestained Protein Ladder*; Fermentas).

3.1.6. Inmunohistoquímica:

Las muestras de ILT y mamas fueron fijadas en 3.7% de paraformaldehído e incluidas en parafina. Para la inmunohistoquímica se hicieron cortes de 5µm, se usó Apo A1 (Anticuerpo casero hecho en conejo) como anticuerpo primario. Posteriormente se incubó con el anticuerpo secundario y AB Complex/HRP (Vector laboratories) durante 30 minutos. Finalmente los cortes fueron teñidos con 3,3-diaminobenzamina (Dako) y montados con DPX (Dibutylfitalato, MERCK).

3.1.7. Determinación de la apolipoproteína A1:

Se realizó la determinación de la Apo A1 por un método inmuno-turbidimétrico con anticuerpos ovinos frente a Apo A1 humana. Los coeficientes de variación total (CV) fueron entre 3,43% a 121 mg/L y 6,72% a 5,80 mg/L. El calibrador está estandarizado frente al estándar de referencia IFCC SP1-01 (IRP de la OMS).

3.2. Resultados:

3.2.1. Western Blot de P-selectina en plaquetas de pacientes con AAA:

Se ha descrito que la P-selectina se encuentra en los gránulos alfa de las plaquetas, y tras la activación celular se transloca rápidamente hacia la superficie celular, donde se mantiene expuesta (Soong, C.V., 1993). De hecho, se considera que la P-selectina es un importante marcador de enfermedad vascular, dado que diversos estudios han demostrado que las plaquetas aumentan la expresión de P-selectina en su superficie a medida que evoluciona la formación de lesiones vasculares (Norman, P., 2004). Hemos observamos un aumento de P-selectina en pacientes frente al grupo control ($n=9$) lo que indica que la P-selectina pueda ser un marcador de daño aneurismal [1.1 ± 0.6 vs 0.7 ± 0.2 vs 0.5 ± 0.2 a.u., $p < 0.05$ vs controles] (Figura 14).

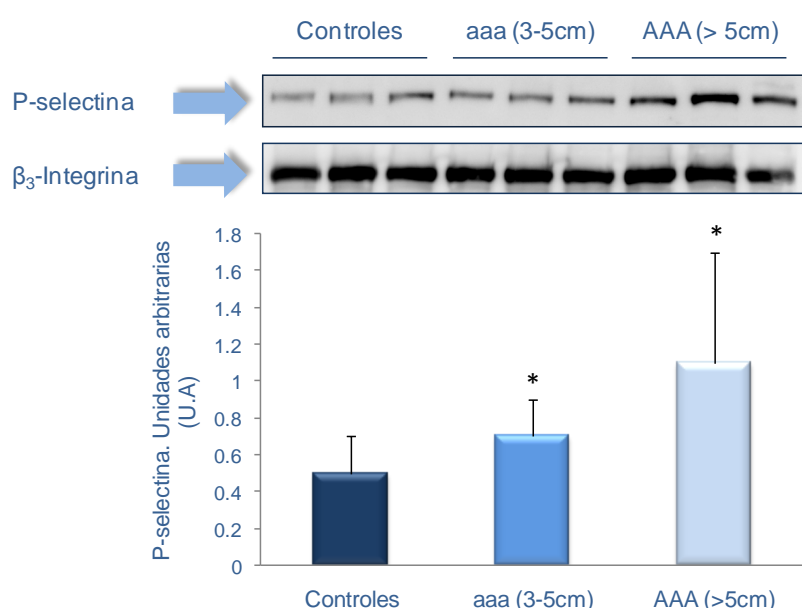


Figura 14: Western Blot de P-selectina en plaquetas lisadas de los pacientes y controles sanos ($n=9$) y representación gráfica de la cuantificación obtenida (* $p < 0.05$ vs controles).

En este sentido estudios previos habían descrito que la P-selectina como marcador de activación plaquetaria y que estaba aumentada en medio condicionado de la capa luminal del ILT en comparación con las otras capas, así como en el plasma de pacientes con AAA en comparación con un grupo control (Touat, Z., 2006). Nuestros resultados sugieren que existe un nivel de activación basal de las plaquetas de pacientes con AAA caracterizado por el aumento de la P-selectina. También se había observado en ratones deficientes para P-selectina que la formación de AAA está atenuada tras la inducción del aneurisma mediante la inyección de elastasa (Hannawa, K.K., 2006).

3.2.2. 2D-DIGE en plaquetas de pacientes con AAA:

Tras el análisis de los geles 2D-DIGE por el *Decyder* se encontraron 79 *spots* diferenciales entre los tres grupos de estudio. El análisis posterior de los *spots* en el espectrómetro de masas nos permitió identificar 50 de esas proteínas diferenciales (Figura 15). Este experimento proporcionó un listado de proteínas con perfiles de expresión diferenciales con una variación de ± 1.5 veces el ratio y $p < 0.05$ como valor. (Tabla 2)

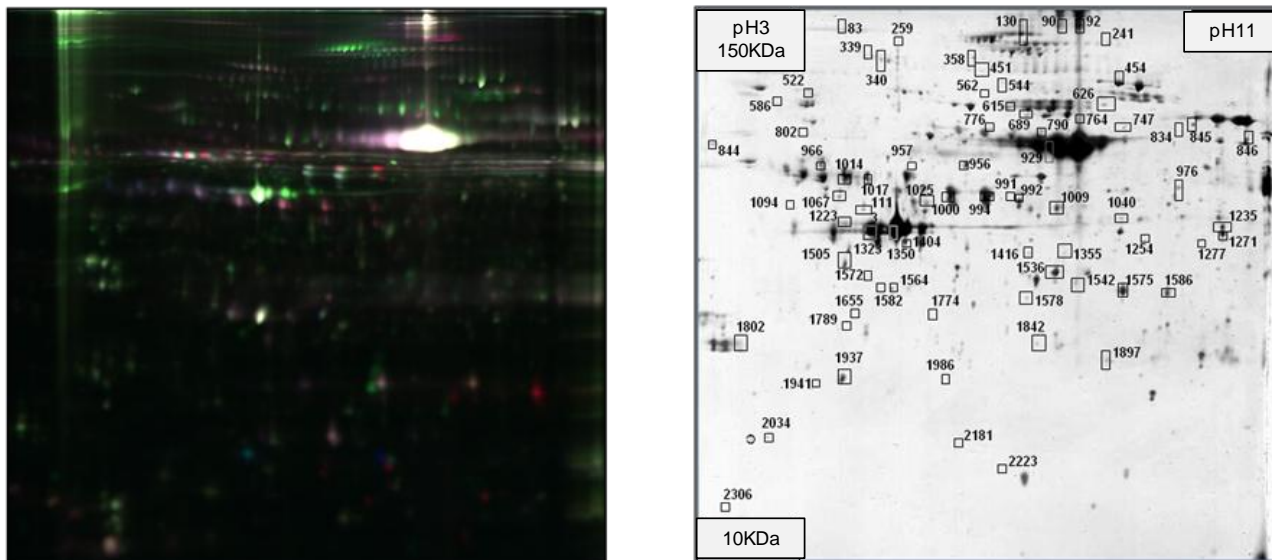


Figura 15: Geles 2D de plaquetas. A la izquierda gel representativo de 2D-DIGE. A la derecha gel teñido con plata en el que se señalan los *spots* diferenciales entre los diferentes grupos de estudio.

Mediante el análisis de componentes principales por el programa *Decyder* observamos que los grupos de sujetos utilizados se comportan de manera similar y que tienden a agruparse (Figura 16).

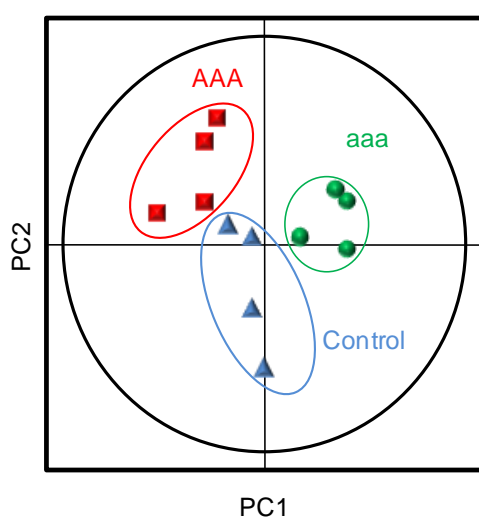


Figura 16: Análisis de componentes principales.

Por espectrometría de masas se identificaron un conjunto de proteínas que se pueden agrupar en diferentes grupos de acuerdo a su función (ver tabla 2). Se observó que de las proteínas identificadas las más abundantes son proteínas sanguíneas y relacionadas con la coagulación. Y en menor proporción se identificaron proteínas de membrana, de transporte, de estrés oxidativo y de citoesqueleto. Algunas de las proteínas identificadas con un perfil de expresión alterado entre los tres grupos están implicadas en formación de la matriz extracelular y citoesqueleto. Las proteínas del citoesqueleto regulan la traslocación de las proteínas a la membrana plasmática, por lo tanto tienen implicación en la interacción plaquetaria y su activación. Se han observado en los pacientes un aumento de proteínas como la filamina A, proteína localizada en el citoesqueleto y de unión a actina que participa en la estabilidad mecánica de la célula y en la interacción con proteínas que regulan la adhesión celular como la beta-integrina-1 y diversas proteínas kinasas. La gp96 o Grp94 (*Glucose Regulated Protein 94*, proteína reguladora de la glucosa 94) esta aumentada en aneurismas pequeños, es una proteína de choque térmico encargada del plegamiento de proteínas intracelulares y está implicada en el crecimiento celular, diferenciación y supervivencia. También se ha descrito como un componente de la matriz mitocondrial que desempeña un papel en la inducción de la apoptosis en respuesta ROS (Eletto, D., 2010). Otra de las proteínas identificadas que están aumentadas en pacientes es la gelsolina, una proteína intracelular fijadora de calcio que regula la estructura intracelular y el metabolismo. Se ha observado que la gelsolina esta aumentada en el PRP acompañado de un aumento de los niveles de calcio en pacientes con enfermedad coronaria, siendo la gelsolina un posible biomarcador de daño coronario (Liu, Y., 2011). La glutathion transferasa omega-1 (GSTO-1) es una familia de proteínas implicada en procesos importantes como los mecanismos de desintoxicación. Observamos que la GSTO-1 esta elevada en pacientes con aneurisma superior a 5cm en comparación al grupo con aneurisma pequeño en respuesta al aumento de estrés oxidativo presente en estos pacientes (Nebert, D.W., 2004). También hemos visto un aumento en los pacientes de los niveles de ceruloplasmina, un marcador de fase aguda que aumenta en las enfermedades inflamatorias y en los síndromes coronarios agudos (Tang, W.H., 2012).

Destacar también la identificación de la pro-apolipoproteína-A1 (Apo A1) que se encuentra aumentada en el grupo control con respecto a los pacientes (Figura 17). Esta proteína precursora de la lipoproteína de alta densidad (HDL), es una proteína clave en el transporte reverso del colesterol, proceso que protege del desarrollo de aterosclerosis (Fielding, C.J., 1995). Debido a la implicación de los niveles de HDL en el desarrollo del AAA decidimos hacer un estudio de la implicación de la Apo A1 en la enfermedad aneurismática.

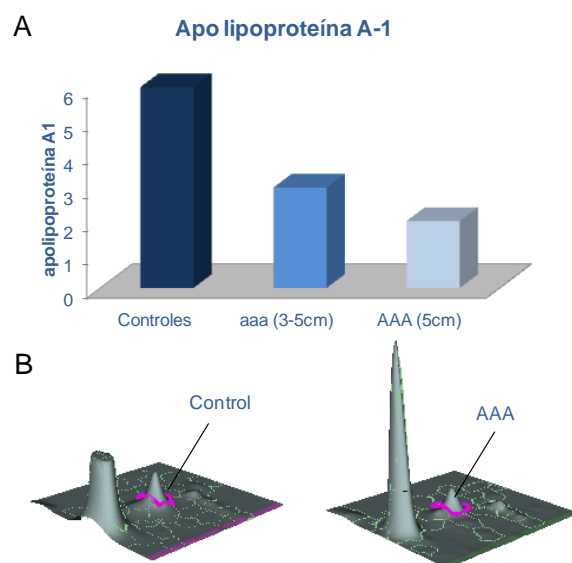


Figura 17: A) Representación gráfica de las concentraciones obtenidas de la Apo A1 en plaquetas por *Decyder software*.

B) Imagen obtenida del *Decyder software* de la Apo A1

3.2.3. Western Blot de Apo A1 en plaquetas y en sobrenadantes del ILT:

Observamos en el western blot de plaquetas de pacientes [controles n=10, aaa (3-5 cm) n=8 y AAA (>5 cm) n=10], que los niveles de Apo A1 tienden a disminuir en pacientes con aneurisma grande en comparación a los controles, aunque esta diferencia no es significativa (Figura 18) (controles 0.57 ± 0.21 vs aaa 0.46 ± 0.25 vs AAA 0.44 ± 0.29 ; unidades arbitrarias).

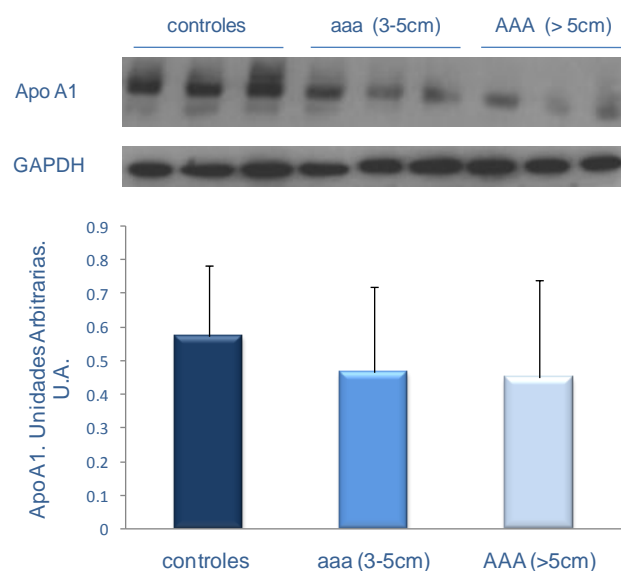


Figura 18: Western Blot de Apo A1 en lisados de plaquetas de controles, pacientes con aneurismas pequeños y aneurismas grandes. Representación gráfica de la cuantificación de los resultados obtenidos.

En el western blot de sobrenadantes de tejido observamos que hay un aumento significativo de Apo A1 en la capa luminal del trombo en comparación con la capa media y la media sana (Figura 19) (2170394.8 ± 554005.4 vs 960348.6 ± 613797.7 vs 447340 ± 72346.2 ; unidades arbitrarias).

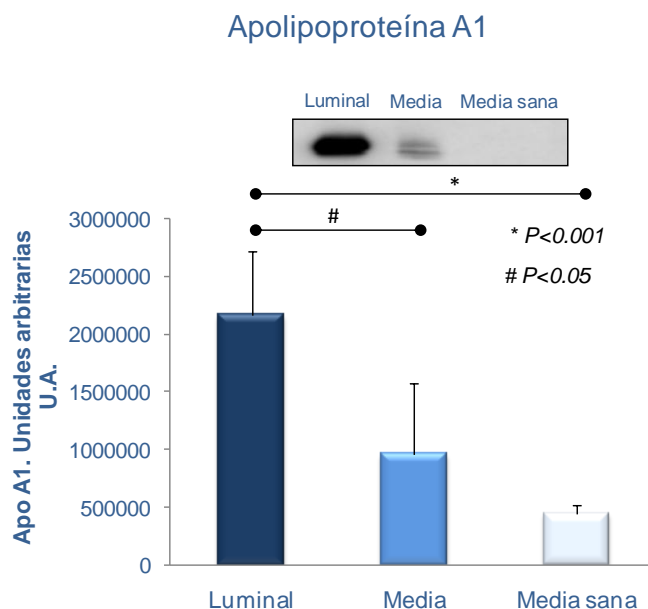


Figura 19: Western Blot de Apo A1 en sobrenadantes de las capas del ILT (n=5) y representación gráfica de los resultados obtenidos.

3.2.4. Inmunohistoquímica de Apo A1 en el ILT:

Por inmunohistoquímica observamos que hay una mayor tinción de Apo A1 en la zona luminal del trombo. La capa luminal esta en contacto con el torrente sanguíneo y por ello observamos mayor tinción de Apo A1 (Figura 20).

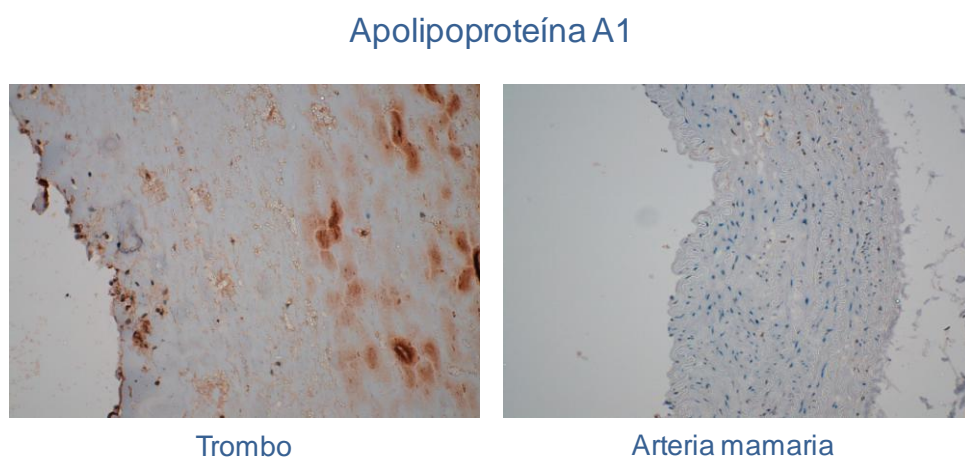


Figura 20: Tinción de la Apo A1 por inmunohistoquímica. Observamos presencia de Apo A1 en la capa luminal del trombo, por otro lado no se observa tinción en la arteria mamaria.

3.2.5. Determinación de la Apo A1 en plasma:

Encontramos niveles elevados de Apo A1 en el plasma de controles con respecto a los pacientes. Se midieron los niveles de Apo A1 en 112 controles, 115 pacientes con aneurisma entre 3-5 cm y 38 pacientes con aneurisma superior a 5 cm. [162(144-184) vs 150(129-168) vs 135(113-144) mg/dl, $p < 0.001$ vs controles]. También mostramos que existe una correlación positiva de los niveles de Apo A1 con los niveles de HDL ($r = 0.9$, $p < 0.001$). Por otro lado observamos que hay una correlación negativa entre la Apo A1 y el tamaño del aneurisma ($r = -0.4$, $p < 0.001$), igualmente mostramos una correlación negativa con la alfa-1-antitripsina (AAT) ($r = -0.33$, $p < 0.001$) (Figura 21).

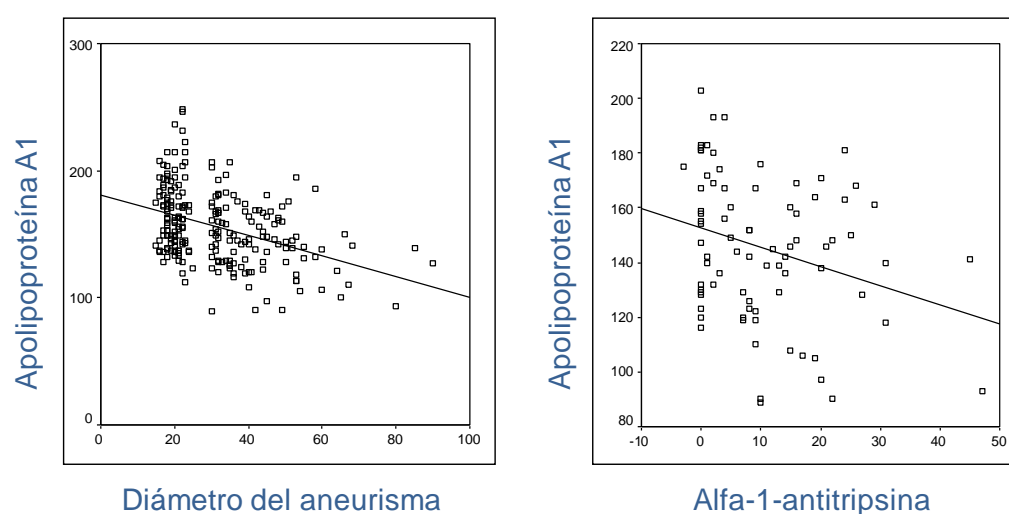


Figura 21: Representación gráfica de la correlación negativa presente entre la Apo A1 con el diámetro aneurismático y la AAT.

La Apo A1 es la apolipoproteína más abundante en el plasma, es el mayor componente proteico de las HDL (Faergeman, O., 2006) que actúa como activador de la enzima lecitina-colesterol-acetiltransferasa y como ligando para el complejo receptor-HDL, localizado en el hepatocito y en diversas células periféricas (Májek, P., 2011).

Las plaquetas, además de su bien conocida función en la trombosis y en la hemostasia, contribuyen a la activación endotelial y modulan respuestas inflamatorias, con lo que favorecen el inicio y la formación de lesiones aterotrombóticas (Nchimi, A., 2010) (Dubick, M.A., 1999). En un estudio preliminar, se detectó la unión de la Apo A1 a las plaquetas por citometría de flujo. Se ha descrito en varios estudios que hay una relación directa entre las lipoproteínas plasmáticas y la función hemostática de las plaquetas. También se piensa que esta interacción de las HDL con las plaquetas, a través de la Apo A1, puede afectar a la composición y función plaquetaria (Ozsavci, D., 2001).

Finalmente observamos un aumento de la Apo A1 en el plasma de controles frente a los pacientes, así como una correlación negativa entre las concentraciones de Apo A1 frente al diámetro del aneurisma y la concentración de AAT. Está descrito que bajas concentraciones de HDL están asociadas a un mayor riesgo

de sufrir AAA. Podemos pensar que la reducción de los niveles de Apo A1 en plaquetas de pacientes pueda deberse a la disminución que también observamos en plasma de esta lipoproteína. Se ha descrito la posible degradación de Apo A1 en la enfermedad aneurismática (Golledge, 2007), y esto puede provocar la acumulación de fragmentos de Apo A1 en el ILT.

Tabla 2. Proteínas diferenciales identificadas en plaquetas de pacientes con AAA frente a un grupo de controles sanos por 2D-DIGE.

punto*	Av.Ratio/t-Test †			proteína ‡	Código de acceso §	Mascot			PM(KDa)/pI	Péptidos	Péptidos	cincidencia
	Crtl vs AAA	Crtl vs aaa	aaa vs AAA			Puntuación total	esperada. #	Iones totales **	Teórico. ††	macheados ‡‡	No macheados §§	(%)
90	-1,66/3.91E-02	-	-	Serum albumin	ALBU_HUMAN	726	1.20E-67	349	71.32/5.92	24	2	40
92	2,12/4.59E-02	-	1,96/4.05E-02	Serum albumin	ALBU_HUMAN	221	4.10E-17	70	71.32/5.92	13	6	22
112	-1,24/0.192	-	-1,61/3.14E-02	filamin A	FLN_HUMAN	156	2,90E-09	NA	248.17/5.65	17	10	11
130	-	-	-1,7/4.62E-02	filamin A	FLN_HUMAN	628	8.30E-58	201	248.17/5.65	41	5	23
259	-	2,24/3.26E-02	-3,01/2.11E-02	ceruloplasmin	CERU_HUMAN	255	3,60E-19	53	116.20/5.43	15	3	15
340	-	1,7/1.54E-02	-1,44/6.82E-02	ceruloplasmin	CERU_HUMAN	152	6,10E-09	51	116.20/5.43	9	5	9
454	-	-	1,7/5.8E-03	Vinculin	VINC_HUMAN	372	7,20E-31	167	117.23/5.83	21	10	24
522	-	1,76/1.49E-02	-	inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4 isoform 2	ITIH4_HUMAN	103	0,00057	73	100.02/6.06	2	1	4
544	-1,8/2.75E-03	-	-1,63/1.01E-02	Complement C3	CO3_HUMAN	188	8.20E-14	50	188.57/6.02	11	0	7
562	1,76/2.31E-02	-	-	Vinculin	VINC_HUMAN	87	0,025	NA	66.17/8.15	6	4	14
586	-1,35/5.5E-04	-	-1,58/4.49E-02	heat shock protein gp96 precursor	ENPL_HUMAN	187	2,30E-12	94	90.31/4.73	7	1	10
615	-2,06/2.12E-02	-	-	Gelsolin	GELS_HUMAN	182	3.10E-13	42	86.04/5.9	11	4	15
747	-	-1,63/9.69E-03	1,6/4.52E-02	albumin, isoform CRA_t	ALBU_HUMAN	168	1,80E-10	NA	60.21/6.66	10	0	21
764	1,46/8.26E-02	-	1,95/3.84E-02	Chain A, Structure Of Human Serum Albumin	ALBU_HUMAN	120	1,10E-05	NA	67.77/5.63	10	7	21
776	-1,6/3.43E-03	-1,68/1.07E-02	-	hemopexin precursor	HEMO_HUMAN	171	1,80E-12	68	52.25/6.57	8	9	22
790	-1,57/5.05E-02	-2,44/2.68E-02	-	hemopexin precursor	HEMO_HUMAN	276	2,90E-21	143	52.25/6.57	13	3	28
802	-	1,74/2.62E-02	-	GRP78 precursor	GRP78_HUMAN	121	1,80E-07	57	72.19/5.03	4	1	9
834	-	-1,57/4.69E-02	-	Fibrinogen alpha chain	FIBA_HUMAN	82	0.0031	58	95.66/5.7	2	2	3
844	-	-	-1,64/3.1E-02	Protein disulfide-isomerase	PDIA1_HUMAN	120	5.20E-07	NA	57.48/4.76	9	3	18
845	-	-	1,69/2.15E-02	Fibrinogen alpha chain	FIBA_HUMAN	102	3.30E-05	NA	95.66/5.7	10	12	13
846	-	-1,62/2.09E-02	-1,51/4.84E-02	Serotransferrin	TRFE_HUMAN	155	1.60E-10	50	79.28/6.81	9	7	16
929	-	-1,95/1.55E-02	-	Chain A, TapasinERP57 HETERODIMER	TPSN_HUMAN	164	4,50E-10	86	54.54/5.61	7	5	19
956	-	-	1,62/3.55E-02	immunoglobulin heavy chain constant alpha 1	IGHM_HUMAN	116	2,90E-05	96	19.74/4.94	1	1	9
957	-	-2,75/1.62E-02	1,94/3.39E-02	Antithrombin	ANT3_HUMAN	174	4,50E-11	78	49.44/5.95	7	5	19
966	-	-	1,6/6.39E-02	Alpha1-Antitrypsin	A1AT_HUMAN	299	1,40E-23	160	44.28/5.37	11	11	36

976	-	-1,66/4.08E-02	1,65/3.37E-02	fibrin beta	FIBB_HUMAN	94	0,0047	NA	51.36/7.95	6	3	15
991	-	-2,27/3.2E-02	1,67/5.14E-02	ER-60 protease	PDIA3_HUMAN	168	1,80E-10	73	57.16/5.98	8	3	18
992	-	-2,06/3.91E-02	-	protein disulfide isomerase family A	PDIA3_HUMAN	429	1,40E-36	191	54.45/6.78	16	4	37
994	-	-1,99/2.37E-02	1,62/3.19E-03	Protein disulfide isomerase	PDIA3_HUMAN	195	1.60E-14	86	57.15/5.98	11	11	28
1014	-	-1,56/3.03E-02	1,61/3.93E-02	fibrinogen gamma chain isoform gamma-B	FIBB_HUMAN	96	0,0032	55	52.11/5.37	3	4	9
1017	-	-1,75/1.38E-02	1,77/2.34E-03	Thymidine phosphorylase	TYPH	129	6.50E08	NA	50.32/5.36	7	0	16
1025	-	-2,02/4.15E-02	2,59/2.42E-02	Human Fibrinogen Fragment D	FRIG_HUMAN	140	2,30E-09	NA	35.50/5.86	7	0	28
1040	-	-1,7/1.76E-02	1,66/9.92E-03	Human Fibrinogen Fragment D	FRIG_HUMAN	136	2,90E-07	51	35.50/5.86	5	3	23
1067	3,39/1.88E-02	-	3,57/4.03E-03	alpha-tubulin	TBA3C_HUMAN	182	1,50E-13	55	50.80/4.94	8	5	21
1094	1,55/3.3E-02	-	-	tubulin, beta	TBB5_HUMAN	89	0,013	NA	59.02/5.09	7	7	13
1113	-	-1,36/8.37E-02	1,63/1.47E-02	TYMP protein	TYPH_HUMAN	72	0,014	54	50.35/5.36	1	0	2
1223	-2,04/4.55E-02	-	-	HP protein	GIL47124562	99	0,0013	NA	31.65/8.48	6	4	27
1235	-	-	1,84/2.8E-02	Pleckstrin	PLEK_HUMAN	121	4.1E-07	55	40.47/8.5	5	4	27
1254	3,2/8.09E-03	-	-	protein kinase C substrate protein P47	PLEK_HUMAN	77	0,0046	57	40.45/8.32	1	0	4
1271	2,23/7.42E-03	-	-	protein kinase C substrate protein P47	PLEK_HUMAN	72	0,014	55	40.45/8.32	1	1	4
1277	2,21/4.17E-02	-	-	protein kinase C substrate protein P47	PLEK_HUMAN	77	0,0043	58	40.45/8.32	1	1	4
1323	-2,31/2.84E-02	-	-	beta actin	ACTB_HUMAN	172	7,20E-11	70	39.45/5.78	6	3	19
1350	2,13/2.78E-02	-	1,64/6.53E-02	beta actin variant	ACTB_HUMAN	604	4,60E-54	434	42.08/5.37	13	13	43
1355	-	-1,6/1.19E-02	-	Apolipoprotein L 1	APOL1_HUMAN	112	3.30E-06	48	44.00/5.6	5	4	13
1404	1,84/9.95E-02	-	3,06/8.06E-03	serpin B6	SPB6_HUMAN	134	4,60E-07	85	42.94/5.18	3	1	8
1416	-	-	3,46/2.17E-02	Actin-related protein 3	ARP3_HUMAN	452	3.30E-40	172	47.80/5.61	17	4	45
1536	-	-1,66/6.83E-02	1,79/4.07E-02	fermitin family homolog 3 short form	URP2_HUMAN	121	9,10E-06	49	75.95/6.32	5	1	9
1572	1,93/7.87E-03	-	-	tubulin beta-1 chain	TBB5_HUMAN	126	2,90E-06	62	50.87/5.05	4	1	8
1575	-1,6/2.23E-04	-	-	NL3	NLGN3_HUMAN	157	2,30E-09	74	24.87/6.3	5	4	19
1586	-2,54/6.54E-04	-	-	NL3	NLGN3_HUMAN	130	1,10E-06	69	24.87/6.3	3	0	12
1600	-1,56/8.99E-03	-	-1,83/3.27E-02	Ficolin-3	FCN3_HUMAN	208	8.20E-16	110	33.40/6.2	6	3	17
1692	-	-	1,64/3.01E-01	Ficolin-3	FCN3_HUMAN	156	1.30E-10	85	33.40/6.2	4	1	11
1720	2,19/1.01E-02	-	-	glutathione S-transferase omega-1 isoform 1	GSTO1_HUMAN	162	7,30E-10	86	27.83/6.23	4	0	16
1774	-	-2,67/7.97E-03	-	serum amyloid P-component precursor	SAMP_HUMAN	158	1,80E-09	94	25.50/6.1	3	0	17
1789	-3,16/2.11E-02	-	-	nuclear chloride channel	9CLIC1_HUMAN	273	5,80E-21	112	27.25/5.02	8	1	45
1915	-2,15/3.32E-02	-	-	proapolipoprotein	APOA1_HUMAN	151	9,00E-09	61	28.94/5.45	7	6	29
1937	-2,02/2.37E-02	-	-	proapolipoprotein	APOA1_HUMAN	115	3,60E-05	79	28.94/5.45	2	1	11

1941	-2,1/2.05E-02	-	-	rho GDP-dissociation inhibitor 2	GDIR2_HUMAN	109	0,00014	49	23.03/5.1	3	0	15
1986	-1,52/3.09E-02	-	-2,42/7.84E-02	serum amyloid P-component precursor	SAMP_HUMAN	201	9,00E-14	75	25.49/6.1	6	0	26
2034	-2,77/7.71E-02	1,85/1,54E-02	-	myosin light chain 2	MLRV_HUMAN	105	7,40E-06	83	19.92/5.09	1	0	5
2181	-2,39/5.79E-03	-1,64/1.38E-02	-	Transthyretin	TTHY_HUMAN	228	3,70E-18	57	13.00/5.33	9	8	62
2125	-1,59/1,96E-02	1,66/3,3E-02	-2,64/1,37E-02	Chloride intracellular cannel protein 1	CLIC1_HUMAN	111	4.10E-06	51	27.25/5.09	3	0	10
2330	-	2,93/4,11E-03	-	Rho GDP-dissociation inhibitor 2	GDIR2_HUMAN	89	0.0007	50	23.03/5.1	2	0	9

* Número del punto de acuerdo a la figura 15

† Ratio cuantificado por DeCyder (aaa vs AAA, Control vs aaa, Control vs AAA)

‡ Proteína identificada

§ Código de acceso a la base de datos NCIB

Mascot

* * Peso molecular y punto isoelectrico teórico

†† Número de péptidos macheados; Número de péptidos no macheados

Secuencia coincidente con la proteína

4. El análisis proteómico de neutrófilos, identifica la catalasa como nuevo biomarcador de aneurisma aórtico abdominal: Posible implicación del estrés oxidativo en la progresión del aneurisma aórtico abdominal.

En esta parte de la tesis desarrollamos el segundo objetivo planteado. Tras el estudio proteómico realizado en plaquetas nos pareció interesante continuar estudiando otros tipos celulares implicados directamente en la formación y desarrollo del AAA y del ILT. Los PMNs participan en la formación del trombo intraluminal, son células implicadas en el sistema inmune y por estudios previos se sabe que participan en el estrés oxidativo y en la degradación e inflamación de la aorta (Michel, J.B., 2011). Los PMNs tienen un papel clave en la patogénesis del AAA como se ha descrito en diferentes estudios realizados en modelos animales. Por otra parte la reducción del número de PMNs tanto en modelos experimentales como en humanos han demostrado un efecto protector frente al desarrollo del aneurisma (Hannawa, K.K., 2006). Por estos motivos, el análisis del conjunto de proteínas expresadas en PMNs es muy interesante porque nos puede permitir identificar posibles biomarcadores de la enfermedad para un mejor diagnóstico y pronóstico pudiendo abrir nuevas rutas para una inhibición farmacológica de la formación y desarrollo del AAA. Hasta ahora, la mayoría de los estudios se han centrado en proteínas individuales relacionadas con la función de los PMNs. El estudio proteómico ofrece la posibilidad de abarcar un mayor número de proteínas y de descubrir aquellas que están alteradas bajo condiciones patológicas. Hasta el momento no se había realizado ningún estudio comparativo de PMNs en enfermedades vasculares. En este trabajo hemos realizado un análisis comparativo 2D-DIGE de las proteínas expresadas en PMNs aislados de pacientes con AAA y controles. Las proteínas diferenciales fueron identificadas mediante espectrometría de masas, y entre las proteínas identificadas tras el análisis proteómico se observó una disminución de la expresión intracelular de proteínas antioxidantes, como la catalasa y tioredoxina reductasa en PMNs de pacientes en comparación con el grupo control. Así la modulación del estrés oxidativo podría entenderse como una herramienta para inhibir este proceso patológico. En ese sentido, estudios previos han visto que la suplementación con catalasa previene frente a cambios patológicos y formación del aneurisma a nivel experimental, apoyando la hipótesis del efecto protector de la catalasa en la formación y desarrollo del AAA (Shi, M.J., 2004). Entre las proteínas identificadas también observamos un aumento de la lipocalina-2 y ciclofilina en pacientes. La lipocalina-2 había sido localizada previamente en la capa luminal del trombo (Ferguson, C.D., 2010). Y la ciclofilina se sabía que podía participar en diferentes mecanismos implicados en la remodelación vascular (Sato, K., 2009). Estos resultados aumentan el interés del estudio de estas proteínas como posibles marcadores biológicos de la patogénesis de la enfermedad.

Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology

JOURNAL OF THE AMERICAN HEART ASSOCIATION



Proteomic Analysis of Polymorphonuclear Neutrophils Identifies Catalase as a Novel Biomarker of Abdominal Aortic Aneurysm: Potential Implication of Oxidative Stress in Abdominal Aortic Aneurysm Progression

Priscila Ramos-Mozo, Julio Madrigal-Matute, Roxana Martinez-Pinna, Luis Miguel Blanco-Colio, Juan Antonio Lopez, Emilio Camafeita, Olivier Meilhac, Jean-Baptiste Michel, Cesar Aparicio, Melina Vega de Ceniga, Jesus Egido and José Luis Martín-Ventura

Arterioscler Thromb Vasc Biol 2011, 31:3011-3019: originally published online September 22, 2011

doi: 10.1161/ATVBAHA.111.237537

Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology is published by the American Heart Association, 7272 Greenville Avenue, Dallas, TX 752514

Copyright © 2011 American Heart Association. All rights reserved. Print ISSN: 1079-5642. Online ISSN: 1524-4636

The online version of this article, along with updated information and services, is located on the World Wide Web at:

<http://atvb.ahajournals.org/content/31/12/3011>

Subscriptions: Information about subscribing to Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology is online at
<http://atvb.ahajournals.org/subscriptions/>

Permissions: Permissions & Rights Desk, Lippincott Williams & Wilkins, a division of Wolters Kluwer Health, 351 West Camden Street, Baltimore, MD 21202-2436. Phone: 410-528-4050. Fax: 410-528-8550. E-mail:
journalpermissions@lww.com

Reprints: Information about reprints can be found online at
<http://www.lww.com/reprints>

Proteomic Analysis of Polymorphonuclear Neutrophils Identifies Catalase as a Novel Biomarker of Abdominal Aortic Aneurysm: Potential Implication of Oxidative Stress in Abdominal Aortic Aneurysm Progression

Priscila Ramos-Mozo, Julio Madrigal-Matute, Roxana Martinez-Pinna, Luis Miguel Blanco-Colio, Juan Antonio Lopez, Emilio Camafeita, Olivier Meilhac, Jean-Baptiste Michel, Cesar Aparicio, Melina Vega de Ceniga, Jesus Egido, José Luis Martín-Ventura

Objective—Polymorphonuclear neutrophils (PMNs) play a main role in abdominal aortic aneurysm (AAA) progression. We have analyzed circulating PMNs isolated from AAA patients and controls by a proteomic approach to identify proteins potentially involved in AAA pathogenesis.

Methods and Results—PMNs from 8 AAA patients (4 large AAA >5 cm and 4 small AAA 3–5 cm) and 4 controls were analyzed by 2D differential in-gel electrophoresis. Among differentially expressed spots, several proteins involved in redox balance were identified by mass spectrometry (eg, cyclophilin, thioredoxin reductase, catalase). Diminished catalase expression and activity were observed in PMNs from AAA patients compared with controls. In contrast, PMNs from AAA patients displayed higher H₂O₂ and myeloperoxidase levels than PMNs from controls. Moreover, a significant decrease in catalase mRNA levels was observed in PMNs after phorbol 12-myristate 13-acetate incubation. Catalase plasma levels were also decreased in large (n=47) and small (n=56) AAA patients compared with controls (n=34). We observed catalase expression in AAA thrombus and thrombus-conditioned medium, associated with PMN infiltration. Furthermore, increased H₂O₂ levels were observed in AAA thrombus-conditioned medium compared with the media layer.

Conclusion—Diminished catalase levels in circulating PMNs and plasma are observed in AAA patients, supporting an important role of oxidative stress in AAA evolution. (*Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011;31:3011-3019.)

Key Words: aneurysms ■ antioxidants ■ leukocytes

Abdominal aortic aneurysm (AAA) is an important health problem in elderly. In cross-sectional studies, the prevalence varies from 3% to 8%.¹ In elderly men, AAAs may cause as much as 2% to 3% of all deaths.¹ Because AAAs are usually asymptomatic, the present clinical challenges are early diagnosis and deciphering the biological mechanisms responsible for the progressive dilatation and final rupture to develop new diagnostic and therapeutic approaches.

Although polymorphonuclear neutrophils (PMNs) represent the major class of leukocytes, they have received little attention in atherothrombosis.^{2,3} However, recent evidence is revealing a previously unappreciated role of PMN in experimental^{4,5} and human^{6,7} AAAs. PMNs can contribute to main mechanisms of AAA evolution, namely intraluminal thrombus (ILT) formation, oxidative stress, proteolytic degradation of the aortic media, and adventitial inflammation.⁸ AAAs are

characterized by the presence of a mural ILT-containing platelets, red blood cells (RBCs), and PMNs, particularly abundant within the luminal layer of human thrombus.^{6–8} AAAs are also characterized by destructive connective tissue remodeling, including depletion of aortic elastin and fragmentation of medial elastic fibers.⁹ Finally, inflammatory cells (macrophages and neutrophils) are also evident within the adventitia of human AAAs.¹⁰ Interestingly, PMNs depletion is able to inhibit experimental AAA formation.¹¹ More recently, short-term preoperative doxycycline therapy improved the proteolytic balance in human AAA, presumably via an effect on aortic wall neutrophil content.¹²

These data highlight the potential interest of analyzing the PMNs proteome with the aim of identifying novel diagnostic and prognostic targets in AAA disease. Furthermore, identification of biomarkers could also afford novel pathogenic

Received on: January 24, 2011; final version accepted on: September 12, 2011.

From the Vascular Research Laboratory (P.R.-M., J.M.-M., R.M.-P., L.M.B.-C., J.E., J.L.M.-V.) and Vascular Surgery (C.A.), Instituto de Investigaciones Sanitarias, Fundación Jiménez Díaz, Autonoma University, Madrid, Spain; Unidad de Proteómica, Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares, Madrid, Spain (J.A.L., E.C.); Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, U698, Univ Paris 7, College Hospital University, X-Bichat, Paris, France (O.M., J.-B.M.); Galdakao Hospital, Bilbao, Spain (M.V.d.C.).

Correspondence to José Luis Martín-Ventura, PhD, Vascular Research Laboratory, Fundación Jiménez Díaz-Instituto de Investigaciones Sanitarias, Autonoma University, Av Reyes Católicos 2, 28040 Madrid, Spain. E-mail jlmartin@fjd.es

© 2011 American Heart Association, Inc.

Arterioscler Thromb Vasc Biol is available at <http://atvb.ahajournals.org>

DOI: 10.1161/ATVBAHA.111.237537

Downloaded from <http://atvb.ahajournals.org/> at INSERM - DISC on February 15, 2012

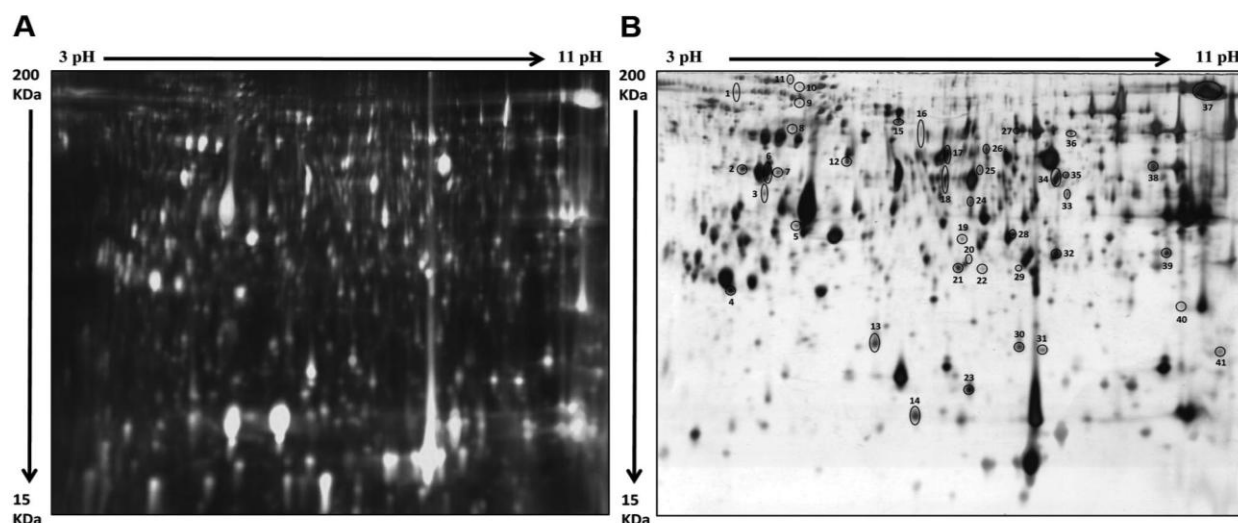


Figure 1. Differential in-gel electrophoresis analysis. Polymorphonuclear neutrophil (PMN) protein extracts of 8 abdominal aortic aneurysm (AAA) patients and 4 controls were labeled with the corresponding CyDye reagents, mixed, resolved on 6 independent differential in-gel electrophoresis gels, imaged (red, Cy3; green, Cy5; blue, Cy2) and analyzed with DeCyder software. **A**, A representative gel image from the differential in-gel electrophoresis experiment is shown. Proteins were resolved in the 3 to 11 (nonlinear) pH range on the first dimension and on 12% polyacrylamide gels on the second dimension. **B**, Spots showing statistically significant regulation between the 2 conditions were excised from silver-stained gels and identified by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. Identified spots are numbered as in Supplemental Table II.

pathways and may thus open possibilities for pharmacological inhibition of growth, providing tools for monitoring this inhibition.¹³ Until now, most studies have focused on the role of individual proteins related to different PMNs function/activities. Expression proteomic studies offer the possibility of finding out proteins that could be dysregulated in PMNs under pathological conditions. Previous studies analyzing expression proteome of PMNs have been recently thoroughly reviewed.¹⁴ However, no studies have addressed the comparison of PMN proteome in vascular diseases. In the present study, we have performed a comparative 2D differential in-gel electrophoresis protein expression analysis of circulating PMNs isolated from AAA patients and controls.

Methods

AAA Patients

The blood samples used for proteomic analysis were obtained from 8 AAA patients before they underwent infrarenal AAA repair ($n=4$ large AAA, AAA diameter >5 cm) or patients who visited the vascular surgery department for follow-up assessment ($n=4$ small AAA, AAA diameter 3–5 cm). The control group consisted of 4 volunteers (AAA diameter <3 cm) without significant differences from the patient groups in age, sex, risk factors, or medications. Furthermore, 12 additional patients (6 large AAA and 6 small AAA) and 6 additional controls were used for further validation of the proteomic results. Finally, for further functional studies, PMNs were isolated from 10 additional controls and 10 patients (4 large AAA and 6 small AAA) and incubated with 50 $\mu\text{mol/L}$ phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) (Sigma-Aldrich) or vehicle for 30 minutes (for hydrogen peroxide [H_2O_2]) or for 4 hours (for myeloperoxidase [MPO] and catalase/manganese superoxide dismutase [MnSOD] mRNA analysis) at 37°C.

In addition, 103 consecutive patients with an asymptomatic infrarenal AAA were recruited, and the AAA size at the time of plasma sample collection was registered (Supplemental Table I,

available online at <http://atvb.ahajournals.org>). Similarly, 34 controls were recruited from a screening program, which is currently being performed among the population in the area under our care. They were randomly selected from the screened individuals with nondilated (<30 mm, confirmed with abdominal ultrasound) infrarenal aortas. The study was approved by the scientific ethical committees of our institutions, and informed consent was obtained from the patients and the controls for their inclusion in the study.

AAA Tissue and Tissue-Conditioned Medium

Ten AAA tissue samples were collected during surgical repair and dissected into ILT and medial layer. AAA samples were obtained from patients undergoing surgery, enrolled in the RESAA protocol (REflet Sanguin de l'évolutivité des Anévrismes de l'Aorte abdominale, CCPPRB Paris-Cochin Nos. 2095, 1930, and 1931).¹⁵ All patients gave their written informed consent, and the protocol was approved by a French ethics committee (CCPPRB, Cochin Hospital). AAA thrombus and aortic walls were cut into small pieces (5 mm^2) and separately incubated in RPMI 1640 medium containing antibiotics and an antimycotic (Gibco) for 24 hours at 37°C (6 mL/g of wet tissue). The conditioned medium (supernatant containing proteins released by the tissue sample) was obtained after centrifugation at 3000g for 10 minutes at 20°C.

Human Neutrophils

Neutrophils were obtained from heparinized venous blood by centrifugation in Ficoll-Paque (GE Healthcare) followed by 6% dextran sedimentation of the pellet and hypoosmotic lysis of residual erythrocytes. Neutrophils were resuspended in lysis buffer (7 mol/L urea, 2 mol/L thiourea, 4% CHAPS, and 30 mmol/L Tris-HCl, pH 8.5), and proteins were precipitated to remove salts and other interfering components by using the 2D Clean Up Kit (GE Healthcare). The resulting proteins were resuspended in lysis buffer. The protein concentration was measured using the RC/DC Protein Assay (Bio-Rad).

PMNs purity was assessed by flow cytometry to ensure that they were not contaminated by other cell types. The analysis of CD16

from PMNs showed a strong fluorescence signal (>90% to 95%) in all samples (Supplemental Figure I).

Differential In-Gel Electrophoresis Experiment and Data Analysis

The 6 paired samples were labeled with CyDye Fluor minimal dyes (GE Healthcare) according to the manufacturer's instructions, and isoelectric focusing and second dimension were performed as described in the supplemental material.

The images were analyzed using the DeCyder software, version 7.0 (GE Healthcare), for spot detection and quantification, intergel matching, and statistics. DeCyder calculates the average abundance of each spot among the 6 gels under study. Statistical significance was assessed for each change in abundance using the Student *t* test ANOVA. We considered spots present in all of the 18 images (3 images per gel) with statistical significance at the 95% confidence level for standardized average spot volume ratios greater than 1.5.

Protein Identification by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry

Differentially expressed spots were selected from silver-stained gels for gel excision, automated digestion, and analysis in an Ultraflex matrix-assisted laser desorption ionization (MALDI) tandem time of flight mass spectrometer (Bruker Daltonik) to obtain the corresponding MALDI-mass spectrometry (MS) and MALDI-MS/MS spectra. These MS and MS/MS combined data were used to search a nonredundant protein database (NCBI; ≈ 107 entries; National Center for Biotechnology Information, Bethesda, MD) using the Mascot software (Matrix Science). Detailed information is given in the Supplemental Methods.

Western Blot

Cell extracts from PMNs were sonicated and resuspended in lysis buffer, and protein concentration was quantified by Bradford reagent (Bio-Rad). Equal amounts of PMN proteins (20 μ g) or an equal volume (10 μ L) of AAA tissue-conditioned medium (previously normalized to tissue weight: 6 mL of RPMI per 1g of wet tissue) were used as described in the supplemental material.

Catalase Activity

Similar amounts of PMN extracts were analyzed for catalase activity using a commercial enzymatic assay (K773, Biovision) following the manufacturer's instructions. Catalase units were defined as the amount of enzyme that decomposes 1 μ mol H_2O_2 per minute at pH 4.5 at 25°C.

ELISA

We quantified concentrations of catalase and MPO with commercial kits (E92418HU, USCN Life Science and Hycult) following the manufacturers' instructions.

2,7-Dichlorofluorescein Diacetate

Intracellular H_2O_2 levels in PMNs were measured with 2,7-dichlorofluorescein diacetate (Sigma-Aldrich) as described previously.¹⁶ Briefly, 1×10^6 fresh PMNs were loaded with 5 μ mol/L 2,7-dichlorofluorescein diacetate in Hanks' buffered salt solution at 37°C for 30 minutes and then washed twice. Fluorescence was evaluated with a microplate reader (GENios Tecan) at 535 nm with an excitatory wavelength of 485 nm for 30 minutes. The reactive oxygen species (ROS) production was expressed as relative fluorescence units per second.

RNA Extraction and Real-Time Quantitative-Polymerase Chain Reaction

Total RNA was isolated from cells using TRIzol Reagent (Invitrogen). One μ g of RNA was used to perform the reverse transcribed with High-Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems). Real-time polymerase chain reactions were performed on ABI Prism 7500

sequence detection polymerase chain reaction system (Applied Biosystems) according to the manufacturer's protocol using the delta Ct method as described.¹⁷ Primers and conditions are described in the supplemental material.

Immunohistochemistry

AAA thrombus samples were fixed in 3.7% paraformaldehyde and embedded in paraffin. Immunohistochemistry was performed on 5- μ m sections using Catalase (1:100 Abcam) overnight at 4°C as primary antibody. The peroxidase LSAB + system-horseradish peroxidase kit (Dako) followed by the Histogreen peroxidase substrate (AbCys SA) was used for detection. Sections were then counterstained with Nuclear Fast Red for 5 minutes at room temperature before being mounted using Eukitt medium. Control irrelevant rabbit immunoglobulins (Dako) were applied at the same concentrations as primary antibodies to assess nonspecific staining.

Hydrogen Peroxide Quantification

Quantitative determination of extracellular hydrogen peroxide in ILT conditioned media was performed with a commercial colorimetric kit (907-015, Assay Design), following the manufacturer's instructions.

Statistical Analysis

Results from Western blot, catalase activity, 2,7-dichlorofluorescein diacetate, MPO levels in PMNs, quantitative polymerase chain reaction, and H_2O_2 extracellular levels are expressed as mean \pm SEM and were analyzed by the Mann-Whitney nonparametric test (small and large AAA and control groups) or Wilcoxon paired test (between thrombus and media supernatants of the same samples). Results from the ELISA are expressed as median (interquartile ranges) and were analyzed by the ANOVA test. A probability value <0.05 was considered statistically significant.

Results

Proteomic Analysis of Circulating PMNs

Proteins from neutrophils isolated from different groups of AAA patients (large AAA [AAA diameter >5 cm] and small AAA [AAA diameter 3–5 cm]) and control subjects (AAA diameter <3 cm) were compared by 2D differential in-gel electrophoresis (Figure 1). DeCyder software provided us a list of differentially expressed spots. After silver staining of the gels, only those visible were excised and trypsin digested. Forty-one of them were finally identified by MALDI MS (Supplemental Table II). Proteins known to be expressed by PMN have been identified (eg, lactoferrin, lipocalin 2). In addition, we found proteins involved in different neutrophil functions, such as cytoskeletal proteins (eg, WDR1), inflammatory processes (eg, LT4H) and survival (eg, coronin). Moreover, a high number of proteins involved in redox balance (eg, cyclophilin, catalase, and thioredoxin reductase) were observed.

Decreased Catalase Levels in Circulating PMNs From AAA Patients

Among the differentially expressed proteins identified by MALDI MS, we have focused on the antioxidant protein catalase because of the importance of oxidative stress in AAA progression. The results derived from proteomic data were validated in a second, independent group of patients and controls by Western blot, confirming the decreased catalase expression in PMNs from patients with large and small AAA relative to control subjects (10.4 ± 0.8 and 10.7 ± 1.2 versus

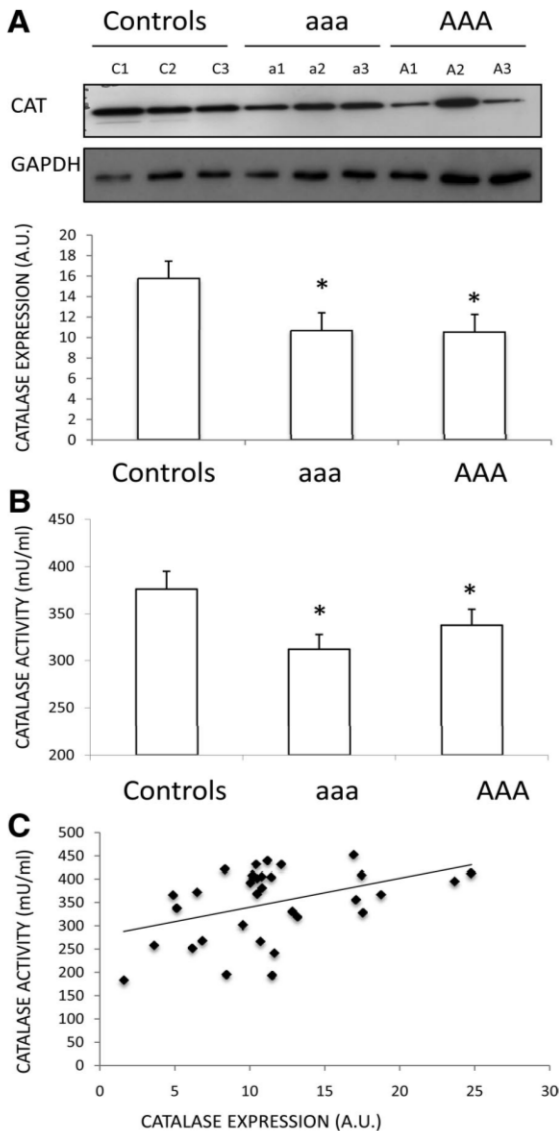


Figure 2. Decreased catalase expression and activity in polymorphonuclear neutrophils (PMNs) from abdominal aortic aneurysm (AAA) patients. **A**, Representative Western blot of catalase and GAPDH in PMN extracts from AAA patients (aaa=AAA <5 cm and AAA=AAA >5 cm) and controls (C). Shown is quantification of catalase expression levels normalized by GAPDH levels in PMNs from AAA patients and controls (n=10, densitometric arbitrary units [A.U.], * $P<0.05$). **B**, Catalase activity in PMN extracts (n=10, mU/mL, * $P<0.05$ vs controls). **C**, Correlation between catalase expression and activity in PMN extracts ($r=0.4$, $P<0.05$).

15.7 ± 2 arbitrary units, $P<0.05$, Figure 2A). Similar results were obtained for thioredoxin reductase (10.8 ± 1.5 and 10.6 ± 1.2 versus 14.8 ± 1.7 arbitrary units, $P<0.05$, not shown). In addition, catalase activity was also assessed in PMNs from patients and controls. As shown in Figure 2B, catalase activity was decreased in PMNs from patients with large and small AAA compared with controls (338 ± 27 and 312 ± 32 versus 376 ± 36 mU/mL, $P<0.05$). Catalase activity

and expression showed a positive correlation ($r=0.4$, $P<0.05$, Figure 2C).

Redox Balance of PMNs From AAA Patients and Controls

To address the prooxidant status of neutrophils, we analyzed H_2O_2 and MPO levels from a third additional group of PMNs isolated of 10 AAA patients (AAA >5 cm [n=4] and AAA <5 cm [n=6]) and controls (n=10). PMNs isolated from both large and small AAA patients displayed higher H_2O_2 intracellular levels compared with PMNs from controls (Figure 3A). In addition, PMNs isolated from both large and small AAA patients released higher MPO concentrations compared with PMNs from controls (Figure 3B). In the other hand, baseline catalase mRNA levels were decreased in AAA patients compared with controls (Figure 3C), in agreement with the results obtained at the protein level (Figure 2A). Similar results were obtained for MnSOD mRNA (Figure 3D).

To address whether decreased catalase expression could be associated with the prooxidant conditions that occur in neutrophils during respiratory burst, neutrophils were incubated with PMA, which is known to induce respiratory burst in PMNs. After PMA incubation, increased H_2O_2 and MPO levels were shown in PMNs from controls, reaching levels similar to those of PMNs from patients (Figure 3A and 3B). Interestingly, we found a significant decrease in catalase mRNA levels after PMA incubation, and a similar trend was observed for MnSOD (Figure 3C and 3D).

Decreased Catalase Plasma Levels in AAA Patients

To address whether the redox imbalance observed in circulating PMNs could also occur in plasma of AAA patients, MPO and catalase were assessed in AAA patients and controls. Similar to the results obtained in circulating PMNs, catalase plasma levels were significantly decreased in large and small AAA patients relative to control subjects (111 [63–175] versus 145 [90–208] versus 159 [132–211] U/mL, median [interquartile range], $P<0.05$ for controls versus small AAA and $P<0.001$ for controls versus large AAA) (Figure 4A). In the other hand, MPO plasma levels were increased in patients with large and small AAA as compared with controls (65 [46–118] versus 65 [54–92] versus 41 [31–51] ng/mL, $P<0.001$ for both large and small AAA versus controls; data not shown). Finally, because aortic diameter is a surrogate marker of the growth rate, we studied the correlation between catalase plasma levels and aortic diameter. Interestingly, a significant negative correlation between catalase plasma levels and aortic diameter was found ($r=-0.4$, $P<0.001$, Figure 4B).

Catalase in AAA Thrombus and Thrombus-Conditioned Media

Because the luminal layer of ILT of human AAA is enriched in PMNs, we evaluated the levels of catalase in both ILT and ILT-conditioned media. As shown in Figure 5A, the luminal part of the thrombus showed an important staining for catalase, associated with poly-lobed nuclei cells, likely to be

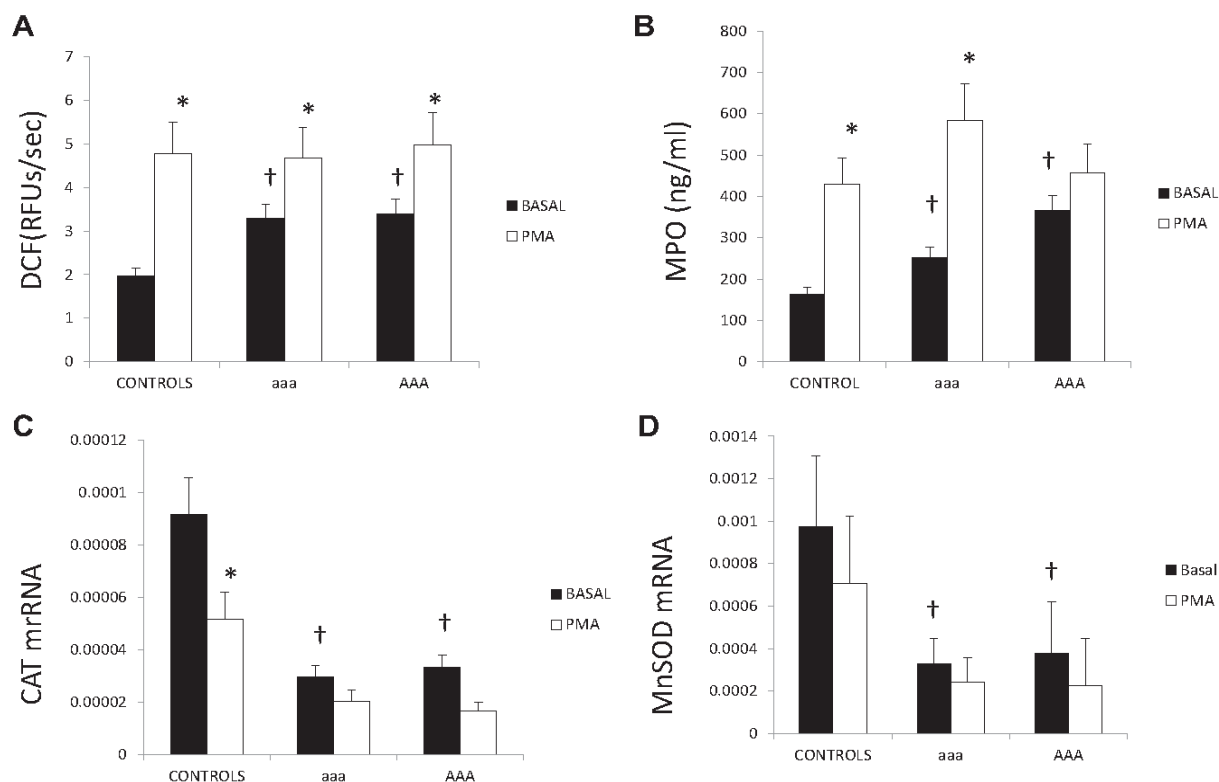


Figure 3. Oxidative status of polymorphonuclear neutrophils (PMNs) from abdominal aortic aneurysm (AAA) patients and controls. PMNs were incubated with vehicle (basal) (black) or with 50 $\mu\text{mol/L}$ phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) (white) for 30 minutes for intracellular H_2O_2 quantification by 2,7-dichlorofluorescein diacetate (DCF) (A) or for 4 hours for myeloperoxidase (MPO) determination by ELISA (conditioned media) (B) and mRNA expression of catalase (C) and manganese superoxide dismutase (MnSOD) (D) analysis by quantitative polymerase chain reaction (controls [n=10]; aaa=AAA <5 cm [n=6] and AAA=AAA >5 cm [n=4], * P <0.05 vs basal, † P <0.05 vs controls). RFU, relative fluorescence units.

neutrophils; however, other catalase-positive cells from non-neutrophil origin are observed in AAA tissue (possibly RBCs). Both cellular and diffuse staining was observed, which suggests the presence of catalase in the extracellular compartment. In this respect, catalase levels were increased in the conditioned media of ILT of AAA compared with that of the media layer (15.9 ± 2.7 versus 7.2 ± 1.6 arbitrary units, P <0.05, Figure 5C). Finally, hydrogen peroxide (H_2O_2) levels were also increased in the ILT compared with the media layer (10.4 ± 2.2 versus 5.2 ± 0.7 $\mu\text{mol/L}$, P <0.05, Figure 5D).

Discussion

PMNs represent the major class of leukocytes. PMNs contribute to main pathological mechanisms of human AAA, such as proteolysis, oxidative stress, and adventitial immune-inflammatory processes.^{6–8} The key role of PMNs in the pathogenesis of AAA is supported by recent studies in animal models of AAA.^{4,5} Furthermore, therapies modifying PMN content in both human and experimental models of AAA have shown a protective effect on AAA development.^{11,12} Because PMNs are key cells in AAA pathophysiology, we have comparatively analyzed circulating PMNs from AAA patients and controls to unveil proteins differentially expressed in pathological conditions, which could provide

information about mechanisms involved in AAA evolution. Among identified proteins previously related to AAA, increased lipocalin 2 and cyclophilin have been observed in PMNs of AAA patients in our study. Lipocalin-2 was previously localized in the luminal part of AAA thrombus, associated with matrix metalloproteinase-9.¹⁸ Cyclophilin could participate in different mechanisms involved in vascular remodeling by promoting inflammation and smooth muscle cell proliferation.¹⁹ Moreover, cyclophilin was shown to enhance vascular oxidative stress and the development of angiotensin II-induced aortic aneurysms.²⁰ These results reinforce the interest and feasibility of analyzing circulating PMNs by proteomic approaches to unveil biomarkers of AAA pathogenesis.

Oxidative stress is the result of an imbalance between antioxidant and prooxidant molecules. Among the proteins identified by proteomic analysis, we showed decreased intracellular expression of antioxidant proteins, such as catalase and thioredoxin reductase, in circulating PMNs from AAA patients compared with controls, whereas cyclophilin was enhanced. Furthermore, we analyzed catalase activity in circulating PMNs, showing a decreased catalase activity of AAA patients compared with controls.

In contrast, we observed that PMNs isolated from AAA patients displayed higher H_2O_2 levels and released higher

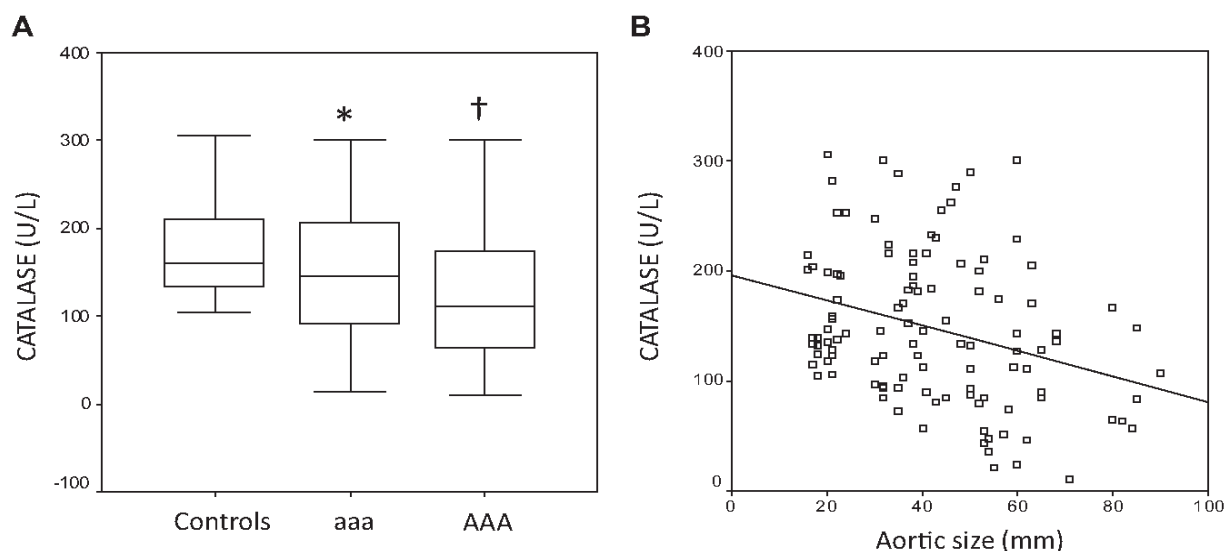


Figure 4. Plasma catalase levels in abdominal aortic aneurysm (AAA) patients. **A**, Catalase levels were significantly increased in plasma from controls ($n=34$) compared with patients with small AAA (aaa) ($n=56$) and large AAA (AAA) ($n=47$) (* $P<0.05$ small AAA vs controls, † $P<0.001$ control vs large AAA). **B**, Correlation between catalase levels and aortic size (Pearson $\rho=-0.4$, $P<0.001$, $n=137$ subjects). U/L indicates units per liter.

MPO concentrations compared with PMNs from controls, paralleled by a decrease in both catalase and MnSOD mRNA expression. Moreover, to test whether these antioxidant systems could be modified under the conditions of increased oxidative stress associated with respiratory burst, neutrophils were incubated with PMA, known to induce respiratory burst in PMNs. Incubation of PMNs from controls with PMA increased both H_2O_2 and MPO levels, reaching levels similar to those of PMNs from patients, probably associated with the saturation of the prooxidant capacity of these cells. Interestingly, after PMA incubation, a significant decrease in catalase mRNA levels were observed, and a similar trend was obtained for MnSOD, which could suggest a global decrease in antioxidant enzymes in PMNs under respiratory burst conditions. On the whole, our data suggest that a redox imbalance toward increased oxidative stress (increased oxidant species such as H_2O_2 and MPO/decreased antioxidant species such as catalase and MnSOD) was observed in PMNs from AAA patients.

At the systemic level, previous studies have analyzed the circulating levels of different prooxidant molecules in AAA patients.²¹ Among them, blood levels of malondialdehyde were significantly increased in AAA patients.²² Likewise, we have measured MPO in plasma of AAA patients, a well-recognized oxidative stress biomarker of different cardiovascular pathologies,^{23,24} showing that MPO plasma levels are increased not only in large AAA,⁷ but also in small AAA. In the other hand, catalase plasma levels were significantly decreased in small and large AAA patients relative to control subjects. However, it should be taken into account that patients and controls exhibited differences in risk factors, as well as treatments that could influence oxidative stress. In contrast, small and large AAA patients showed similar risk factors and medications, suggesting that the differences in

catalase plasma levels could be associated with the progression of the disease. At the tissue level, superoxide anions, as well as lipid peroxidation products have been assessed in human AAA arterial wall as compared with adjacent nonabdominal segments, showing an increased oxidative stress and associated derived-products in AAA segments.²⁵ On the other hand, MnSOD activity in human diseased aorta was $\approx 65\%$ of controls. Furthermore, ruptured AAA tissue also had low SOD activity and protein.²⁶ However, AAA formation is associated with early increases in SOD expression in an experimental model.²⁷ In contrast, the beneficial effect of flow loading limiting experimental AAA formation was associated with increased antioxidant gene (hemoxygenase-1) expression in the aorta.²⁸ In the present study, immunohistochemical analysis showed catalase in human ILT, associated with PMNs. However, other nonnucleated cells, likely RBCs, exhibited a strong immunostaining for catalase. Interestingly, diffuse extracellular staining of catalase was observed in ILT tissue by immunohistochemistry, suggesting its potential release to the extracellular medium. Accordingly, we have shown increased extracellular catalase levels in ILT-conditioned medium, which could be a response to counteract the formation of ROS from extracellular H_2O_2 observed in ILT. In agreement, other authors have shown the presence of catalase in the extracellular medium,²⁹ and they suggest that catalase secretion could be a response to avoid neutrophil-induced oxidative damage at a local level or to regulate the function of ROS as extracellular signaling molecules. However, high catalase levels in ILT could also be due to cell lysis of both PMNs and RBCs. In this respect, the ILT of AAA is characterized by the presence of several blood cells (among them, PMNs and RBCs) and apoptotic cells, and all of them could contribute to increased oxidative stress. In addition to the release of PMN intracellular content (eg, MPO), the

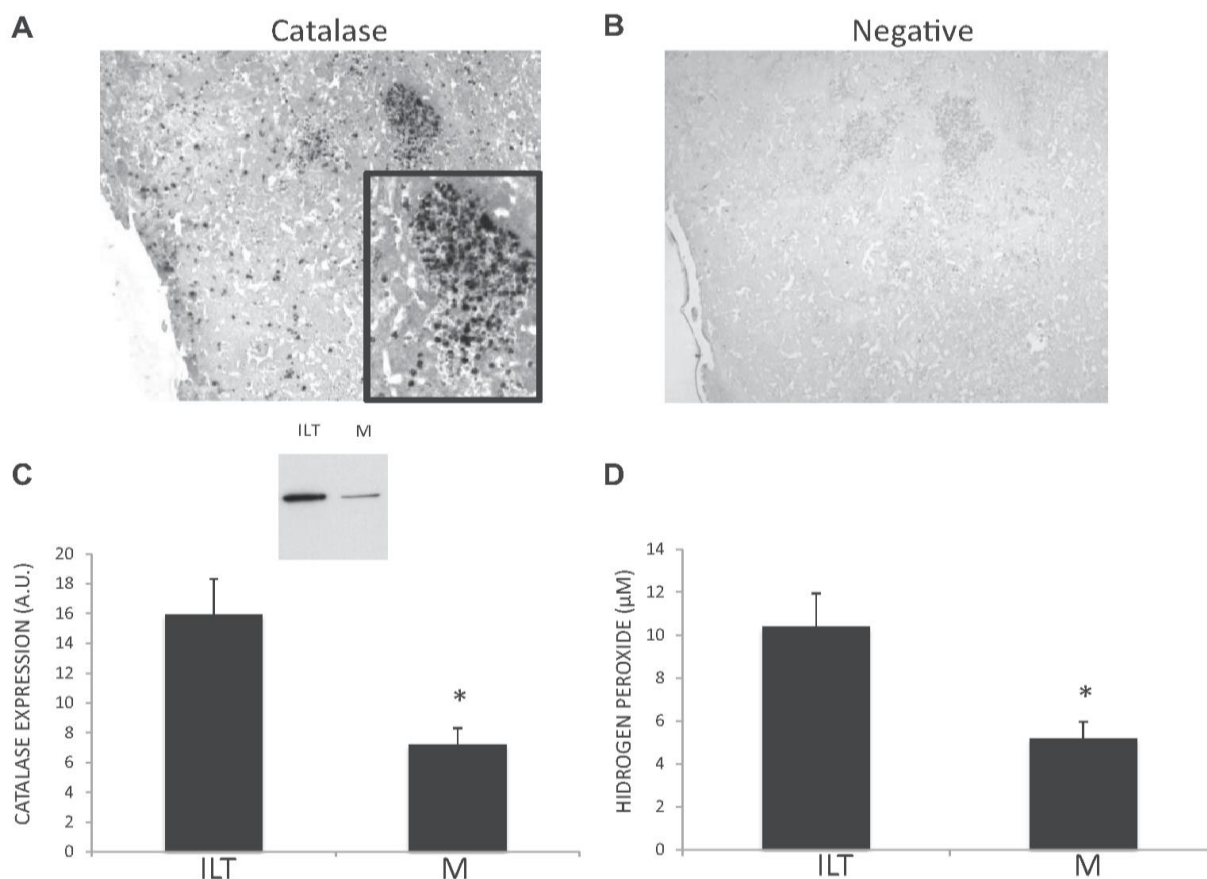


Figure 5. Catalase expression in abdominal aortic aneurysm (AAA) thrombus and thrombus-conditioned medium. **A** and **B**, Immunodetection of catalase in AAA thrombus (**A**) and negative control (**B**) ($\times 10$; inset, $\times 20$). Positivity is shown in green, and nuclei are in red. **C**, Western blot of anticatalase in conditioned medium from intraluminal thrombus (ILT) and medial layer (M) ($n=10$, $*P<0.001$). **D**, Hydrogen peroxide quantification in conditioned media of ILT and healthy media ($n=10$, $P<0.05$).

trapping of RBCs within the thrombus may lead to hemolysis and subsequent release of hemoglobin, heme, and, finally, prooxidant iron. Among ROS, H_2O_2 is a nonradical, uncharged oxidant that is chemically more stable than other ROS and that can permeate through the vascular wall. In addition, H_2O_2 can accumulate extracellularly in the tissue and survive long enough to induce numerous paracrine functions.³⁰ H_2O_2 itself is not very reactive; however, the danger of H_2O_2 comes from its rapid conversion to hydroxyl radical by interaction with a range of transition metal ions, of which the most important *in vivo* is probably iron. Thus, ILT is a privilege site for ROS formation because they can be formed, among other mechanisms, either by MPO-catalyzed or by Fe^{2+} -catalyzed conversion of H_2O_2 .³⁰ On the whole, the imbalance between oxidant species and antioxidant systems in AAA patients, both at the systemic level and the tissue level, further supports the importance of oxidative stress in AAA evolution.

Antioxidant systems are crucial for tissues to detoxify free radical species and protect organisms against oxidative stress. In a previous study, vitamin E attenuated formation of AAA.³¹ Importantly, animals treated with vitamin E showed a 44% reduction in the combined end point of fatal and

nonfatal aortic rupture. More recently, ROS inhibition has been shown to attenuate aneurysm formation.³² Among pathological mechanisms potentially modulated by catalase, it was previously shown that ROS/ H_2O_2 activates endothelial cells to increase PMN adhesion, and catalase is able to prevent leukocyte accumulation.³³ Moreover, overexpression of catalase suppresses oxidized-low-density lipoprotein-induced aortic smooth muscle cell death³⁴ and inhibits smooth muscle cell proliferation.³⁵ In addition, catalase delivery has been successfully used to reduce lipid peroxidation in mice.³⁶ In these studies, the doses used are lower than its endogenous levels,³⁷ suggesting that its therapeutic effects could be associated with its functions outside cells.³⁶ Interestingly, diminished experimental AAA formation by tamoxifen treatment has been associated with increased catalase expression, which was accompanied by decreased PMN infiltration.³⁸ Furthermore, catalase supplementation inhibited experimental aneurysm formation.³⁸ Very recently, catalase overexpression in aortic smooth muscle cells prevents pathological mechanical changes underlying AAA formation.³⁹ On the whole, these studies, including ours suggest a potential protective role of catalase in the mechanisms underlying AAA.

In conclusion, following a proteomic approach to compare circulating PMNs from AAA patients and controls, several proteins have been identified. Among them, we have shown decreased catalase expression and activity in circulating PMNs from AAA patients, paralleled by decreased catalase plasma levels, supporting the main role of oxidative stress in AAA evolution. These results suggest the need for early prevention and treatment of prooxidant factors and for the development of approaches that enhance production or activity of antioxidant enzymes.

Acknowledgments

We thank Patricia Llamas Granda and all the staff of Fundación Jiménez Díaz for helping in the collection of human samples.

Sources of Funding

This work was supported by the European Commission, Fighting Aneurysmal Disease project (FP-7, HEALTH F2-2008-200647), the Spanish Ministerio de Ciencia e Innovación (SAF2010/21852), Fundación Ramon Areces, Ministerio de Sanidad y Consumo, Instituto de Salud Carlos III, Redes RECAVA (RD06/0014/0035), EUS2008-03565, and Fundación Pro CNIC.

Disclosures

None.

References

- Sakalihasan N, Limet R, Defawe OD. Abdominal aortic aneurysm. *Lancet*. 2005;365:1577–1589.
- Tilson MD. The polymorphonuclear leukocyte and the abdominal aortic aneurysm: a neglected cell type and a neglected disease. *Circulation*. 2005;112:154–156.
- Baetta R, Corsini A. Role of polymorphonuclear neutrophils in atherosclerosis: current state and future perspectives. *Atherosclerosis*. 2010;210:1–13.
- Hannawa KK, Eliason JL, Woodrum DT, Pearce CG, Roelofs KJ, Grigoriants V, Eagleton MJ, Henke PK, Wakefield TW, Myers DD, Stanley JC, Upchurch GR Jr. L-Selectin-mediated neutrophil recruitment in experimental rodent aneurysm formation. *Circulation*. 2005;112:241–247.
- Pagano MB, Zhou HF, Ennis TL, Wu X, Lambiris JD, Atkinson JP, Thompson RW, Hourcade DE, Pham CT. Complement-dependent neutrophil recruitment is critical for the development of elastase-induced abdominal aortic aneurysm. *Circulation*. 2009;119:1805–1813.
- Fontaine V, Touat Z, Mtairag el M, Vranckx R, Louedec L, Houard X, Andreasson B, Sebbag U, Palombi T, Jacob MP, Meilhac O, Michel JB. Role of leukocyte elastase in preventing cellular re-colonization of the mural thrombus. *Am J Pathol*. 2004;164:2077–2087.
- Houard X, Touat Z, Ollivier V, Louedec L, Philippe M, Sebbag U, Meilhac O, Rossignol P, Michel JB. Mediators of neutrophil recruitment in human abdominal aortic aneurysms. *Cardiovasc Res*. 2009;82:532–541.
- Michel JB, Martin-Ventura JL, Egido J, Sakalihasan N, Treska V, Lindholt J, Allaire E, Thorsteinsdottir U, Cockerill G, Swedenborg J. For the FAD EU consortium. Novel aspects of the pathogenesis of aneurysms of the abdominal aorta in humans. *Cardiovasc Res*. 2011;90:18–27.
- Thompson RW, Geraghty PJ, Lee JK. Abdominal aortic aneurysms: basic mechanisms and clinical implications. *Curr Probl Surg*. 2002;39:110–230.
- Michel JB, Thauinat O, Houard X, Meilhac O, Caligiuri G, Nicoletti A. Topological determinants and consequences of adventitial responses to arterial wall injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007;27:1259–1268.
- Eliason JL, Hannawa KK, Ailawadi G, Sinha I, Ford JW, Deogracias MP, Roelofs KJ, Woodrum DT, Ennis TL, Henke PK, Stanley JC, Thompson RW, Upchurch GR Jr. Neutrophil depletion inhibits experimental abdominal aortic aneurysm formation. *Circulation*. 2005;112:232–240.
- Lindeman JH, Abdul-Hussien H, van Bockel JH, Wolterbeek R, Kleemann R. Clinical trial of doxycycline for matrix metalloproteinase-9 inhibition in patients with an abdominal aneurysm: doxycycline selectively depletes aortic wall neutrophils and cytotoxic T cells. *Circulation*. 2009;119:2209–2216.
- Golledge J, Tsao PS, Dalman RL, Norman PE. Circulating markers of abdominal aortic aneurysm presence and progression. *Circulation*. 2008;118:2382–2392.
- Luerman GC, Uriarte SM, Rane MJ, McLeish KR. Application of proteomics to neutrophil biology. *J Proteomics*. 2010;73:552–561.
- Caligiuri G, Rossignol P, Julia P, Groyer E, Mouradian D, Urbain D, Misra N, Ollivier V, Sapoval M, Boutouyrie P, Kaveri SV, Nicoletti A, Lafont A. Reduced immunoregulatory CD31+ T cells in patients with atherosclerotic abdominal aortic aneurysm. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006;26:618–623.
- Carter WO, Narayanan PK, Robinson JP. Intracellular hydrogen peroxide and superoxide anion detection in endothelial cells. *J Leukoc Biol*. 1994;55:253–258.
- Martin-Ventura JL, Madrigal-Matute J, Munoz-Garcia B, Blanco-Colio LM, Van OM, Zalba G, Fortuño A, Gomez-Guerrero C, Ortega L, Ortiz A, Diez J, Egido J. Increased CD74 expression in human atherosclerotic plaques: contribution to inflammatory responses in vascular cells. *Cardiovasc Res*. 2009;83:586–594.
- Folkesson M, Kazi M, Zhu C, Silveira A, Herndahl AL, Hamsten A, Hedin U, Swedenborg J, Eriksson P. Presence of NGAL/MMP-9 complexes in human abdominal aortic aneurysms. *Thromb Haemost*. 2007;98:427–433.
- Satoh K, Matoba T, Suzuki J, O'Dell MR, Nigro P, Cui Z, Mohan A, Pan S, Li L, Jin ZG, Yan C, Abe J, Berk BC. Cyclophilin A mediates vascular remodeling by promoting inflammation and vascular smooth muscle cell proliferation. *Circulation*. 2008;117:3088–3098.
- Satoh K, Nigro P, Matoba T, O'Dell MR, Cui Z, Shi X, Mohan A, Yan C, Abe J, Ilig KA, Berk BC. Cyclophilin A enhances vascular oxidative stress and the development of angiotensin II-induced aortic aneurysms. *Nat Med*. 2009;15:649–656.
- McCormick ML, Gavrila D, Weintraub NL. Role of oxidative stress in the pathogenesis of abdominal aortic aneurysms. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007;27:461–469.
- Papalambros E, Sigala F, Georgopoulos S, Paraskevas KI, Andreadou I, Menenakos X, Sigalas P, Papalambros AL, Vourliotakis G, Giannopoulos A, Bakoyiannis C, Bastounis E. Malondialdehyde as an indicator of oxidative stress during abdominal aortic aneurysm repair. *Angiology*. 2007;58:477–482.
- Zhang R, Brennan ML, Fu X, Aviles RJ, Pearce GL, Penn MS, Topol EJ, Sprecher DL, Hazen SL. Association between myeloperoxidase levels and risk of coronary artery disease. *JAMA*. 2001;286:2136–2142.
- Martin-Ventura JL, Leclercq A, Blanco-Colio LM, Egido J, Rossignol P, Meilhac O, Michel JB. Low plasma levels of HSP70 in patients with carotid atherosclerosis are associated with increased levels of proteolytic markers of neutrophil activation. *Atherosclerosis*. 2007;194:334–341.
- Miller FJ Jr, Sharp WJ, Fang X, Oberley LW, Oberley TD, Weintraub NL. Oxidative stress in human abdominal aortic aneurysms: a potential mediator of aneurysmal remodeling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002;22:560–565.
- Dubick MA, Keen CL, DiSilvestro RA, Eskelson CD, Ireton J, Hunter GC. Antioxidant enzyme activity in human abdominal aortic aneurysmal and occlusive disease. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1999;220:39–45.
- Sinha I, Pearce CG, Cho BS, Hannawa KK, Roelofs KJ, Stanley JC, Henke PK, Upchurch GR Jr. Differential regulation of the superoxide dismutase family in experimental aortic aneurysms and rat aortic explants. *J Surg Res*. 2007;138:156–162.
- Nakahashi TK, Hoshina K, Tsao PS, Sho E, Sho M, Karwowski JK, Yeh C, Yang RB, Topper JN, Dalman RL. Flow loading induces macrophage antioxidative gene expression in experimental aneurysms. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002;22:2017–2022.
- Sureda A, Ferrer MD, Tauler P, Maestre I, Aguiló A, Córdova A, Tur JA, Roche E, Pons A. Intense physical activity enhances neutrophil antioxidant enzyme gene expression. Immunocytochemistry evidence for catalase secretion. *Free Radic Res*. 2007;41:874–883.
- Suvorova T, Kojda G. Reactive oxygen species as cardiovascular mediators: lessons from endothelial-specific protein overexpression mouse models. *Biochim Biophys Acta*. 2009;1787:802–810.
- Gavrila D, Li WG, McCormick ML, Thomas M, Daugherty A, Cassis LA, Miller FJ Jr, Oberley LW, Dellsperger KC, Weintraub NL. Vitamin E inhibits abdominal aortic aneurysm formation in angiotensin II-infused apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25:1671–1677.

32. Xiong W, Mactaggart J, Knispel R, Worth J, Zhu Z, Li Y, Sun Y, Baxter BT, Johanning J. Inhibition of reactive oxygen species attenuates aneurysm formation in a murine model. *Atherosclerosis*. 2009;202:128–134.
33. Gasic AC, McGuire G, Krater S, Farhood AI, Goldstein MA, Smith CW, Entman ML, Taylor AA. Hydrogen peroxide pretreatment of perfused canine vessels induces ICAM-1 and CD18-dependent neutrophil adherence. *Circulation*. 1991;84:2154–2166.
34. Guo ZM, Van Remmen H, Yang H, Chen XL, Mele J, Vijg J, Epstein CJ, Ho YS, Richardson A. Changes in expression of antioxidant enzymes affect cell-mediated LDL oxidation and oxLDL-induced apoptosis in mouse aorta cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2001;21:1131–1138.
35. Shi MJ, Yang H, Motley ED, Guo ZM. Overexpression of Cu/Znsu-peroxide dismutase and/or catalase in mice inhibits aorta smooth muscle cell proliferation. *Am J Hypertens*. 2004;17:450–456.
36. Nishikawa M, Hashida M, Takakura Y. Catalase delivery for inhibiting ROS-mediated tissue injury and tumor metastasis. *Adv Drug Deliv Rev*. 2009;61:319–326.
37. Nishikawa M, Tamada A, Kumai H, Yamashita F, Hashida M. Inhibition of experimental pulmonary metastasis by controlling biodistribution of catalase in mice. *Int J Cancer*. 2002;99:474–479.
38. Grigoryants V, Hannawa KK, Pearce CG, Sinha I, Roelofs KJ, Ailawadi G, Deatrick KB, Woodrum DT, Cho BS, Henke PK, Stanley JC, Eagleton MJ, Upchurch GR. Tamoxifen up-regulates catalase production, inhibits vessel wall neutrophil infiltration, and attenuates development of experimental abdominal aortic aneurysms. *J Vasc Surg*. 2005;41:108–114.
39. Maiellaro-Rafferty K, Weiss D, Joseph G, Wan W, Gleason RL, Taylor WR. Catalase overexpression in aortic smooth muscle prevents pathological mechanical changes underlying abdominal aortic aneurysm formation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2011;301:H355–H362.

SUPPLEMENT MATERIAL

METHODS

DIGE protein labeling, 2DE and image acquisition and DIGE data analysis

Samples were labeled with CyDye Fluor minimal dyes (GE Healthcare) according to manufacturer's instructions. Briefly, 50µg of protein extracts were mixed with 400pmol of the N-hydroxysuccinimide esters of Cy3 or Cy5 fluorescent cyanine dyes on ice in the dark for 30 min. An equal amount of each sample included in the experimental sample set was combined to create the internal standard. The internal standard was labeled with Cy2. The labeling reactions were stopped with 1µL of 10mM lysine on ice in the dark for 10min.

The six-paired samples of Cy3 and Cy5-labeled proteins were mixed with 50µg of Cy2-labeled internal standard. The mixtures were diluted in Rehydration Buffer (7M urea, 2M thiourea, 4% CHAPS, 0.8% IPG Buffer 3-11NL and bromophenol blue) containing 50mM DTT, and resolved on 24cm IPG strips pH3–11 non-linear gradient IPG strips. The samples were applied by cup loading to the previously rehydrated IPG strips with 450µL of the mentioned Rehydration Buffer containing 97mM DeStreak reagent (GE Healthcare). The isoelectric focusing (IEF) was performed using an IPGphor II IEF system (GE Healthcare) until a total of 42kVh following a stepwise voltage increase: 300V for 3h, linear gradient to 1000V in 4h, linear gradient to 8000V in 2h and 8000V until the steady state was reached. IEF strips were then equilibrated in buffer containing 6M urea, 30% glycerol, 2% SDS and 30mM Tris-HCl and trace amounts of bromophenol blue for 15 minutes with addition of 1% DTT. Finally, strips were incubated with the same buffer containing 4% iodoacetamide instead of DTT for 15 additional minutes. Second dimension was performed on 12% polyacrylamide gels at 17W/gel using an Ettan Dalt Six device (GE Healthcare). Gels

were scanned on a Typhoon 9400 (GE Healthcare) and Cy2-, Cy3-, and Cy5-labeled images of each gel were acquired at excitation/emission wavelength values of 488/520, 523/580 and 633/670 nm respectively. Finally, gels were fixed in 12% methanol and 7% acetic acid, and silver stained using a commercial kit (GE Healthcare).

The images were analyzed using the DeCyder version 7.0 software (GE Healthcare) for spot detection and quantification, inter-gel matching and statistics. DeCyder calculates the average abundance of each spot among the six gels under study. Statistical significance was assessed for each change in abundance using Student's t-test ANOVA analysis. We considered spots present in all of the 18 images (three images per gel) with statistical significance at 95% confidence level for standardized average spot volume ratios over 1.5.

In-Gel Trypsin Digestion

Protein spots from silver-stained gels were manually excised from gels, and transferred to pierced V-bottom 96-well polypropylene microplates (Bruker Daltonik). Samples were digested automatically using a Proteineer DP protein digestion station (Bruker Daltonik). The gel pieces were submitted to reduction with 10 mM DTT (GE Healthcare) in 50mM ammonium bicarbonate (99.5% purity; Sigma Chemical) and alkylation with 55mM iodoacetamide (Sigma Chemical) in 50mM ammonium bicarbonate. Gel pieces were then washed with 50mM ammonium bicarbonate and acetonitrile (gradient grade; Merck) and dried with a nitrogen stream. The samples were digested with trypsin 8ng/μL at 37°C for 8h (sequencing grade; Promega) 50mM ammonium bicarbonate was added to the dry gel pieces. After digestion, the peptides were extracted with 0.5% trifluoroacetic acid (99.5% purity; Sigma Chemical).

Other relevant search parameters were set as follows: enzyme, trypsin; fixed modifications, carbamidomethyl (C); allow up to 1 missed cleavage; peptide tolerance ± 20 ppm; MS/MS tolerance ± 0.5 Da. Protein scores greater than 82 were considered significant ($p < 0.05$).

Western-blot

Cell extracts from PMNs were sonicated, resuspended in lysis buffer and protein concentration was quantified by Bradford reagent (BioRad). Equal amount of PMN proteins (20 μ g) or equal volume (10 μ l) of AAA tissue conditioned-media (previously normalized to tissue weight: 6mL RPMI/1g of wet tissue) was runned on denaturing SDS/12% (w/v) polyacrylamide gels. Proteins were then blotted onto PVDF (Immobilion-P; Millipore) membranes and the blots were blocked with 10% (w/v) non-fat dry milk in TBST (0.01M Tris (pH 7.7), 0.1M NaCl and 0.1% Tween 20). The membranes were incubated with monoclonal antibodies against either Catalase (1:1000 abcam) or GADPH (1:5000 Santa Cruz). After, they were incubated with HRP (horseradish peroxidase)-conjugated anti-(rabbit or mouse IgG) antibodies at a dilution of 1:2500. The proteins were then detected by enhanced chemiluminescence (ECL Western Blotting Detection Reagents, GE Healthcare) and evaluated by densitometry (Quantity One; BioRad Laboratories). Pre-stained protein markers (PageRuler™ Prestained Protein Ladder; Fermentas) were used for molecular mass determinations

Real-time PCR

Quantification of Catalase and MnSOD mRNA levels were done by amplification of cDNA using SYBR® Green. The primer sequences were as follows: Catalase (NM_001752.3; predicted size 210 bp) sense: 5'- TTAATCCATTCGATCTCACC - 3', and antisense: 5'- GGCGGTGAGTGTCAGGATAG -3'; MnSOD (NM_000636.2,

predicted size 54 bp) sense: 5'- CACTCGTGGCTGTGGTGGCT -3', and antisense: 5'- GCTGATGCCGCCGATCTGCT -3'; 18S (NR_003286.2, predicted size 125 bp) sense: 5'- CCGTCGTAGTTCCGACCATAA -3', and antisense 5'- CAGCTTTGCAACCATACTCCC -3'. Expression levels are given as ratio to housekeeping gene 18S and data is expressed as ΔCt . The relative quantification was done using the comparative CT method and expressed as arbitrary units.

Table I online. Characteristics of the patients included in the study.

	Small aaa patients (n=56)	Large AAA patients (n=47)
Age (years)	72±8	71±8
Sex (Male/Female)	54 (96%) / 2 (4%)	45 (96%) / 2 (4%)
Active smoking	18/56 (32%)	15/47 (32%)
Hypertension	38/56 (68%)	23/47 (49%)
Diabetes mellitus	14/56 (25%)	8/47 (17%)
Hypercholesterolemia	32/56 (57%)	29/47 (62%)
Cardiac disease	13/56 (23%)	7/47 (15%)
Chronic Obstructive Pulmonary Disease	10/56 (18%)	9/47 (19%)
Chronic renal failure	0/56 (0%)	4/47 (9%)

TABLE II online. *Proteins altered in PMNs from AAA patients and control subjects found by 2D-DIGE/MS*

Spot *	DeCyder †						Protein description §	Accession code §	Score	Mascot #						Cov. ††
	C vs aaa		C vs AAA		aaa vs AAA					Expected	Ions score	MW(KDa)/ pI**	Matched ††	Unmatched ††		
	Av. Ratio	p-value	Av. Ratio	p-value	Av. Ratio	p-value										
1	—	—	-1.2	8.2E-02	-1.35	3.1E-02	Lactoferrin	gi 28948741	108	1.60E-04	NA	77.93/8.47	8	4	12	
2	1.68	4.2E-02	3.6	6.3E-02	—	—	Guanine nucleotide-binding protein G(i)	gi 23398623	214	4.00E-15	97	39.10/5.27	6	0	14	
3	1.52	4.5E-02	—	—	—	—	Actin cytoplasmic 1	gi 15277503	172	1.40E-12	93	40.54/5.55	4	0	16	
4	-1.34	7.4E-02	1.58	4.7E-02	2.12	4.3E-02	Actin cytoplasmic 2	gi 178045	162	1.40E-11	102	26.15/5.65	3	0	20	
5	—	—	1.41	6.3E-02	—	—	glyoxalase domain containing 4	gi 217330598	191	8.00E-13	NA	33.55/5.4	11	3	41	
6	1.86	5.4E-02	2.6	6.7E-02	—	—	Actin cytoplasmic 1	gi 15277503	535	7.10E-49	346	40.54/5.55	11	3	35	
7	1.88	3.4E-02	2.98	2.1E-02	—	—	Actin cytoplasmic 1	gi 15277503	139	2.80E-09	NA	40.54/5.55	7	0	25	
8	—	—	—	—	-1.83	4.2E-02	Copine-3	gi 4503015	172	6.30E-11	68	60.95/5.6	6	0	12	
9	—	—	-1.28	1.1E-02	—	—	ubiquitin-activating enzyme E1	gi 23510338	126	2.50E-06	NA	118.86/5.49	9	1	10	
10	—	—	1.26	3.3E-02	—	—	alpha-actinin 1	gi 54304187	79	2.60E-03	54	10.19/5.41	1	0	13	
11	1.48	0.03	1.66	6.7E-02	—	—	Major vault protein	gi 1097308	203	5.00E-14	58	100.14/5.34	9	0	15	
12	1.52	1.4E-02	—	—	—	—	ARP3 actin-related protein 3 homolog B	gi 5031573	149	1.30E-08	NA	47.80/5.61	9	4	23	
13	—	—	-1.69	0.03	-1.48	9.2E-02	Nucleoside diphosphate kinase A	gi 35068	136	5.70E-09	62	20.74/7.07	4	2	26	
14	-1.31	7.8E-02	-2.14	5.6E-03	-1.63	2.3E-02	gelsolin	gi 55960301	135	7.10E-09	54	29.11/7.71	4	0	13	
15	1.92	3.6E-02	2.41	7.1E-02	—	—	Leukotriene A4 Hydrolase	gi 51247429	231	8.00E-17	49	69.65/5.73	11	1	25	
16	—	—	1.42	3.3E-02	1.46	0.02	Thioredoxin reductase 1, cytoplasmic	gi 3820535	101	1.80E-05	NA	55.32/6.36	7	4	16	
17	1.43	3.1E-02	1.93	9.9E-02	—	—	Coronin-1A	gi 5902134	257	4.50E-21	119	51.38/6.25	9	4	18	
18	1.54	4.3E-02	—	—	—	—	Actin-related protein 3B	gi 5031571	233	1.10E-18	115	45.02/6.3	8	6	29	
19	—	—	—	—	1.28	3.9E-02	Proteasome subunit alpha type-7	gi 4506179	265	7.10E-22	137	29.82/6.15	7	2	36	
20	-2.29	2.3E-02	—	—	NS	—	phosphoglycerate mutase 1	gi 114326546	141	8.00E-08	NA	28.93/6.67	7	4	25	
21	—	—	-1.76	2.8E-02	-1.51	1.6E-02	phosphoglycerate mutase 1	gi 4505753	162	1.40E-11	NA	28.90/6.67	10	1	51	
22	—	—	—	—	2.12	3.3E-02	phosphoglycerate mutase 1	gi 114326546	141	8.00E-08	NA	28.93/6.67	7	1	38	
23	—	—	-1.43	8.4E-02	—	—	Rho GDP-dissociation inhibitor 1	gi 4757768	263	1.10E-21	163	23.25/5.02	6	2	25	
24	1.58	0.03	—	—	—	—	transaldolase	gi 5803187	104	4.00E-04	NA	37.69/6.36	7	2	24	
25	—	—	1.61	0.03	1.62	8.4E-02	adenosine kinase	gi 32484975	107	2.00E-04	NA	40.92/6.24	6	0	12	
26	—	—	—	—	1.38	4.3E-02	Coronin-1A	gi 5902134	206	2.50E-14	51	51.68/6.25	12	7	20	
27	—	—	3.48	3.80E-03	—	—	catalase	gi 4557014	440	1.00E-37	175	59.95/6.9	17	5	42	
28	1.62	5.6E-02	2.27	9.5E-02	—	—	esterase D/formylglutathione hydrolase	gi 33413400	256	2.50E-19	123	31.96/6.54	8	5	30	
29	—	—	1.69	3.4E-02	—	—	phosphoglycerate mutase 1	gi 4505753	400	2.30E-35	189	28.90/6.67	12	7	56	
30	—	—	-1.86	2.8E-02	—	—	adenylyl cyclase-associated protein	gi 5453595	146	5.70E-10	69	51.93/8.07	5	0	10	
31	—	—	1.19	9.1E-03	1.36	5.7E-02	Ras-related protein Rab-7a	gi 34147513	214	9.00E-17	87	23.76/6.4	6	0	40	
32	—	—	2.04	2.9E-03	2.14	6.3E-02	adenylyl cyclase-associated protein	gi 5453595	193	1.10E-14	96	51.93/8.07	7	3	21	
33	—	—	2.69	8.4E-03	3.01	5.02E-03	DNA-(apurinic or apyrimidinic site) lyase	gi 18375501	172	1.40E-12	52	35.93/8.33	7	2	30	
34	—	—	3.46	3.1E-02	5.47	3.2E-02	gelsolin	gi 38044288	380	2.30E-33	284	80.88/5.58	8	7	11	
35	—	—	3.39	2.4E-02	4.37	0.02	gelsolin	gi 38044288	176	5.70E-13	104	80.88/5.58	5	1	6	
36	2.12	5.8E-02	3.1	2.9E-02	—	—	carbonic anhydrase I	gi 4502517	124	9.00E-08	NA	28.91/6.59	6	1	38	
37	—	—	-1.73	2.8E-02	-1.39	2.3E-02	Human Seminal Lactoferrin	gi 28948741	1220	1.00E-115	647	77.93/8.47	38	2	61	

38	2.06	4.1E-02	—	--	--	—	phosphoglycerate kinase 1	gi 4505763	178	3.60E-13	84	44.99/8.3	6	1	20
39	—	—	2.69	8.4E-03	3.01	5.03E-03	adenylyl cyclase-associated protein	gi 5453595	170	2.30E-12	119	51.93/8.07	3	1	11
40	-1.27	5.56E-03	—	--	--	—	lipocalin 2	gi 55961101	146	5.70E-10	67	22.95/8.66	4	1	22
41	-1.35	9.9E-02	—	--	--	—	cyclophilin	gi 181250	190	2.30E-14	97	22.65/9.33	5	0	23

* Spot number according to Figure 1

† Average volume ratio and p-values from t-test as quantified by DeCyder software (---: Spots without statistical significance; C, Control; aaa, small AAA; AAA, large AAA; Higher protein expression levels is indicated by positive average ratios)

§ Protein ID and accession number according to NCBI database

Mascot score, expectation value and ions score (NA: Not applicable, that applies to proteins identified just with their corresponding Protein Mass Fingerprint. Ions score applies to peptide MS/MS fragmentation spectra)

** Theoretical protein molecular weight (MW) and isoelectric point (pI)

†† Number of peptides matching the protein sequence, number of unmatched peptides and percentage of protein sequence coverage (Cov).

5. Estudio del estrés oxidativo en eritrocitos de pacientes con AAA

Continuando el estudio de las posibles alteraciones en el estrés oxidativo de los pacientes y siendo el eritrocito una célula con elevada capacidad antioxidante (debido a que al ser transportadora de hierro tiene que tener un sistema antioxidante muy regulado), nos pareció importante realizar un estudio en este tipo celular, completando así el objetivo 3a planteado. Se ha descrito la presencia de glóbulos rojos en el ILT como células implicadas en la formación y evolución del trombo. Se piensa que los eritrocitos a través del grupo hemo son una fuente importante de estrés oxidativo capaz de modificar lípidos y proteínas que conduce a la progresión de la patología (Michel, J.B., 2011). Continuando así el estudio de células sanguíneas implicadas en la formación del ILT realizamos un estudio de catalasa así como de Prdx-2 en membranas y citosoles de eritrocitos mediante western blot.

5.1. Materiales y Métodos:

5.1.1. Aislamiento de la membrana de eritrocitos:

Se recogió sangre total de pacientes y controles sanos en tubos EDTA. Se aislaron las membranas de 10 controles sanos y 20 pacientes con aneurisma. El aislamiento de las membranas de eritrocitos se hizo en dos fases: la primera fase es un gradiente de densidad mediante centrifugación con dextrano al 6% (Alvarez-Llamas, G., 2009), en la segunda fase los eritrocitos son lavados con un buffer de lavado (5mM Na₂HPO₄, pH 8, 1mM EDTA y 0.9% NaCl). Después son lisados con buffer de lisis (5mM Na₂HPO₄, pH 8; 1mM EDTA; 1mM PMSF) por centrifugación a 1500 rpm durante 15 minutos, proceso que se repite cuatro veces. Y por último una centrifugación de 14000 rpm durante 30 minutos. Los pellets de las membranas de eritrocitos se recogen y se guardaron a -80°C.

5.1.2. Western Blot:

Las membranas de eritrocitos obtenidas fueron resuspendidas en buffer de lisis [(urea 7M, tiourea 2M, CHAPS 4%, Tris 30mM (pH 8.5)] y sonicadas, la concentración de proteína fue cuantificada mediante el método colorimétrico Bradford (Sigma-Aldrich). Para el western se usaron 20ug de proteína de las membranas y 10ul del citoplasma de eritrocitos aislados. Las proteínas se separaron en geles de SDS-PAGE al 12%. Después las proteínas se transfirieron a membranas de PVDF (Immobilion-P Millipore) y fueron bloqueadas al 10% de leche en TBST [1x (0.01M Tris (pH7.7), 0.1M NaCl y 0.1% Tween 20)]. Las membranas fueron incubadas con anticuerpos anti-catalasa (1:1000; Abcam) y anti-peroxirredosina-2 (Prdx-2) (1:200; Santa Cruz). Después fueron incubadas con sus correspondientes anticuerpos secundarios HRP (anti- rabbit o anti-mouse, 1:2500). Las proteínas fueron detectadas por quimioluminiscencia (ECL *Western Blotting Detection Reagents*, GE Healthcare) y cuantificadas con el programa Quantity One (Quantity One;

Bio-Rad Laboratories). Se usó un marcador de peso molecular para determinar la banda de nuestra proteína (PageRuler™ *Prestained Protein Ladder*; Fermentas).

Los resultados obtenidos por western blot fueron expresados como la media \pm SEM y analizados mediante el test no paramétrico de Mann-Whitney.

5.2. Resultados:

5.2.1 Western Blot de catalasa y Prdx-2 en eritrocitos de pacientes con AAA:

Observamos que tanto la catalasa (1.69 ± 0.18 vs 1.14 ± 0.5 , * $p < 0.05$) como la Prdx-2 (1.99 ± 0.69 vs 1.29 ± 0.88 , # $p < 0.05$) están aumentadas significativamente en los controles (n=10) frente a los pacientes (n=10 de diámetro 3-5cm y n=10 de diámetro >5cm) en las membranas de eritrocitos. Mientras que en el citoplasma de eritrocitos no existe variación en los niveles de catalasa y Prdx-2 (Figura 22).

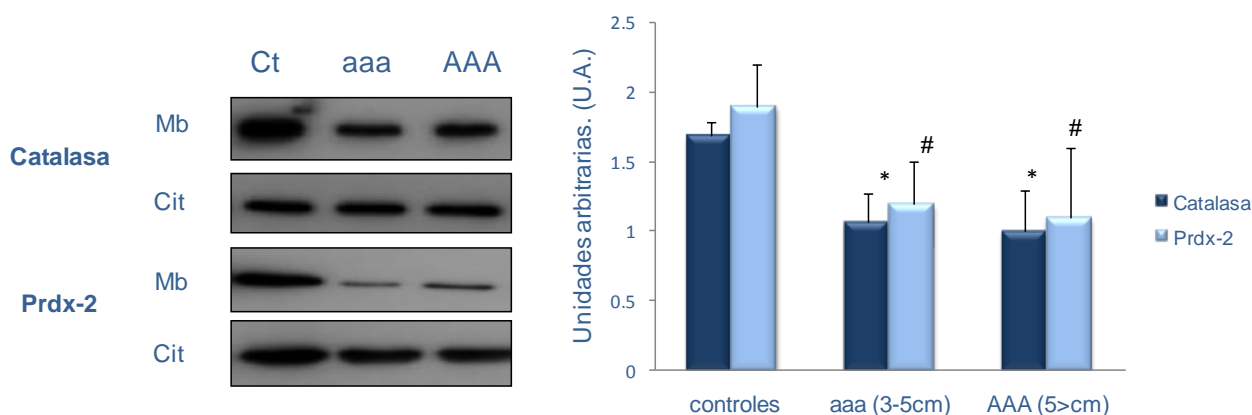


Figura 22: Western Blot de Catalasa y Peroxirredosina-2 en membranas y citoplasma de eritrocitos. Representación gráfica de la cuantificación obtenida.

Mostramos que en membranas de eritrocitos hay un aumento de proteínas antioxidantes como la catalasa y Prdx-2, sin embargo a nivel del citoplasma las concentraciones de estas proteínas son similares. Prdx-2 puede proteger a los eritrocitos del estrés oxidativo intracelular, siendo una importante defensa frente a los hidroperóxidos. Estos resultados verifican lo observado previamente en PMNs y corroboran el aumento de estrés oxidativo presente en estos pacientes y la importancia de un tratamiento antioxidante para prevenir la enfermedad.

6. Función de la Ciclofilina A en el aneurisma de aorta abdominal

Entre las proteínas diferenciales expresadas en PMNs de pacientes con AAA observamos un aumento de ciclofilina A (CypA). En función de los resultados obtenidos anteriormente en PMNs y eritrocitos hemos corroborado la importancia del estrés oxidativo en pacientes con AAA. En este trabajo abordamos el objetivo 3b, analizar el papel de la CypA como posible biomarcador de la progresión del AAA, así como la función de la CypA extracelular en la modulación del equilibrio redox en la pared vascular.

En estudios previos han visto que los niveles de CypA están asociados a la patogénesis de la enfermedad (Sato, K., 2009). Sin embargo, aunque CypA inicialmente se cree que funciona como proteína intracelular, estudios previos bien han revelado que puede ser secretada por las células en respuesta a ROS (Jin, Z.G., 2000). La CypA es una proteína citosólica 18kDa perteneciente a la familia de proteínas de choque térmico, que está implicada en la reparación de proteínas dañadas (Yao, Q., 2005), además de su papel en el plegamiento de las proteínas la CypA tiene otras funciones en la transducción, (Yang, Y., 2008) el tráfico intracelular (Uittenbogaard, A., 1998) y regulación de la transcripción (Garvey, S. M., 2010). Modula la respuesta de la función mitocondrial, inmunológica y participa en procesos fisiopatológicos tales como las enfermedades cardiovasculares, el cáncer y procesos autoinmunes. Aunque la localización principal de CypA es el citosol también se puede encontrar en el núcleo (Zhu, C., 2007) y puede ser secretada al medio extracelular (Liao, D. F., 2000). En el presente trabajo, se tuvo como objetivo analizar el papel potencial de CypA como biomarcador de AAA, así como el papel potencial de CypA extracelular en la modulación del equilibrio redox en las células de músculo liso vascular (CMLV).

Para ello estudiamos los niveles de CypA en el plasma de pacientes con AAA, en el medio condicionado de las diferentes capas del ILT y realizamos estudios *in vitro* con CMLV, estimuladas con H₂O₂. Observamos un aumento de CypA en pacientes con AAA pequeño con respecto al grupo de pacientes con AAA grande y al grupo control. También se observó un aumento de CypA en medio condicionado de la capa media, en comparación a la capa luminal y abluminal, así como un aumento de CypA en la media sana en comparación con la media patológica. Finalmente vimos una disminución de los niveles de anión superóxido en CMLV tras ser estimuladas con H₂O₂ y en presencia de CypA. El efecto protector antioxidante de la CypA extracelular requiere de más estudios adicionales para determinar la función de CypA en el AAA.

ROLE OF EXTRACELLULAR CYCLOPHILIN A IN HUMAN ABDOMINAL AORTIC ANEURYSM.

Tarín Carlos, PhD*, Ramos-Mozo Priscila, BSc*, Madrigal-Matute Julio, BsC*, Blanco-Colio Lus Miguel, PhD*, Meilhac Olivier§, PhD, Michel Jean-Baptiste§, MD, PhD; Egido Jesús, MD, PhD*, Martín-Ventura José Luis, PhD*

*Vascular Research Lab. IIS-Fundación Jiménez Díaz-Autónoma University, Madrid, Spain.

§ Inserm U698, Univ Paris 7, CHU X-Bichat, Paris, France.

ABSTRACT

Oxidative stress is a main mechanism of abdominal aortic aneurysm (AAA) pathogenesis. Cyclophilin A (CypA) is a component of cytosolic heat-shock protein–immunophilin family and has been described as an oxidative stress-induced factor. We aimed to analyze the potential role of CypA as a biomarker of AAA progression as well as the potential role of extracellular CypA in the modulation of redox balance in human VSMC. First, we observed that CypA concentrations are decreased in plasma of patients in the later stages of AAA (AAA diameter >5 cm, surgery) compared to patients in the earlier stages of AAA (AAA diameter = 3–5 cm, follow-up). Second, CypA is mainly released and expressed by VSMC in the pathological media layer, but in a lesser extent than in the normal aortic tissue. Third, extracellular CypA decreases H₂O₂ production induced by a pro-oxidant stimulus in cultured human VSMC.

In conclusion, we have shown decreased circulating levels of CypA in large AAA patients and decrease release of CypA by pathological vascular wall, suggesting that diminution of CypA is associated with AAA progression. Finally, a protective antioxidant effect of extracellular CypA has been observed in VSMC in vitro, although assessment of the biological role of extracellular CypA and its use as potential target will require additional studies.

KEY WORDS: Abdominal aortic aneurysm, Cyclophilin A, Plasma serum, Vascular smooth muscle cells, Reactive Oxygen Species.

INTRODUCTION.

Abdominal aortic aneurysm (AAA) is an important health problem in elderly, being the 13th leading cause in the United States. In cross-sectional studies the prevalence varies from 3% to 8% (1). In elderly men AAAs may cause as much as 2–3% of all deaths (1). Since AAAs are usually asymptomatic, the present clinical challenges are: 1) early disease detection and risk stratification and 2) decipher the biological mechanisms responsible for the progressive dilatation and final rupture. In this respect, among different mechanisms associated to the pathological remodeling that takes place on the arterial wall of AAA [proteolysis,

angiogenesis, immuno-inflammatory processes and depletion of medial vascular smooth muscle cells (VSMCs)], oxidative stress could play a major role (2, 3). Oxidative stress, generated by excessive production of reactive oxygen species (ROS), promotes cardiovascular disease. Although there is a huge knowledge about how ROS deteriorates vascular functions promoting cardiovascular pathology their mechanism are not completely understood.

Cyclophilin A (CypA), a cytosolic 18 kDa protein, is the main member of a highly conserved family of ubiquitous proteins termed immunophilins that is wide distributed among tissues and organisms(4). CypA was discovered as the major cellular target for the immunosuppressive drug cyclosporin A (CsA) (5).CypA has been also described as a multifunctional chaperone that catalyzes the cis-trans isomerization of the peptidyl-prolyl bonds of certain proteins (PPIase activity), helping in protein folding and assembling (6, 7). It is a component of cytosolic heat-shock protein-immunophilin chaperone complex that is involved in repairing damaged proteins due to environmental stresses independently of PPIase activity (8). In addition to its role in protein folding, CypA has been demonstrated to have other roles in signal transduction (9), intracellular trafficking (10) and transcription regulation (11). It modulates mitochondrial function, immune response and it participates in many pathophysiological processes such as cardiovascular diseases, cancer and autoimmune processes (9, 12, 13).

Although the main location of CypA is the cytosol it can also be found in the nuclei (14) and it may be secreted to the extracellular region (15) depending on the physiological state. For example, it has been described that CypA is an oxidative stress-induced factor (15), being secreted by VSMCs and has been shown to activate signaling pathways, proliferation and inflammatory cell migration *in vitro* and *in vivo*(16).

The secretion of CypA in response to ROS production by VSMCs(16) has turned out to further studies on cardiovascular diseases focusing on its autocrine/paracrine effects. Finally, increased circulating CypA concentrations have also been found in patients with inflammatory diseases such as rheumatoid arthritis and sepsis (17, 18).In the present paper, we aimed to analyze the potential role of CypA as a biomarker of AAA as well as the potential role of extracellular CypA in the modulation of redox balance in human VSMC.

MATERIALS AND METHODS

AAA Patients.

Blood samples from 77 consecutive patients with an asymptomatic infrarenal AAA were recruited before undergoing infrarenal AAA repair (n=40, large AAA, AAA diameter >5cm) or who visit the vascular surgery department for follow-up assessment (n=37, small AAA, AAA diameter= 3-5cm) (**Table 1**). The samples are kept in the biobank, Biobanco-FJD IIS-Fundación Jiménez Díaz, and the Scientific Ethical Committee approved the study, obtaining an informed consent from the patients and the controls for their inclusion in the study.

AAA tissue and tissue-conditioned medium.

Ten AAA thrombus and wall samples were collected during surgical repair and dissected into luminal and abluminal parts (at the interface with circulating blood and with the remaining media, respectively). AAA samples were obtained from patients undergoing surgery, enrolled in the RESAA protocol (REflet Sanguin de l'évolutivité des Anévrysmes de l'Aorte abdominale, CCPPRB Paris-Cochin n° 2095, n° 1930 and n° 1931)(26). All patients gave their informed written consent, and the protocol was approved by a French ethics Committee (CCPPRB, Cochin Hospital). Ten control aortas were sampled from dead organ donors with the authorization of the French Biomedicine Agency (PFS 09-007). These control aortic samples were macroscopically normal, devoid of early atheromatous lesions. Different layers of AAA thrombus and wall, as well as healthy walls, were cut into small pieces (5 mm²) and separately incubated in RPMI 1640 medium containing antibiotics and an antimycotic (Gibco) for 24 hours at 37°C (6 ml/g of wet tissue).

The conditioned medium (supernatant containing proteins released by the tissue sample) was obtained after centrifugation as 3,000g for 10 minutes at 20°C.

ELISA.

Plasma concentrations of cyclophilin A were quantified using commercial kit following the manufacturer's instructions (E90979, USCN life science).

Western blot.

Equal volume of AAA tissue conditioned-media (10µl, previously normalized to tissue weight: 1g/6mL) was resolved on denaturing SDS/15% (w/v) polyacrylamide gels. Proteins were then blotted onto PVDF (Immobilion-P; Millipore) membranes and the blots were blocked with 10% (w/v) non-fat dry milk in TBST (0.01M Tris (pH 7.7), 0.1 M NaCl and 0.1% Tween 20). The membranes were incubated with apolyclonal antibody against cyclophilinA (ab41684). After that they were incubated with HRP (horseradish peroxidase)-conjugated anti-rabbit IgG antibody (Dako) at a dilution of 1:2500. The proteins were then detected by enhanced chemiluminescence (ECL Western Blotting Detection Reagents, Amersham Biosciences) and evaluated by densitometry (Quantity One; Bio-Rad Laboratories). Pre-stained protein markers (PageRuler™ Prestained Protein Ladder; Fermentas) were used for molecular mass determinations.

Immunohistochemistry.

AAA thrombus samples and healthy aortas were fixed in 3.7% paraformaldehyde and embedded in paraffin. Immunohistochemistry was performed on 5 µm sections, using cyclophilin Apolyclonal antibody (ab41684). Negative controls using the corresponding IgG were included for checking non-specific staining. The secondary antibody and ABCComplex/HRP were added and sections were stained with 3, 30-diaminobenzidine and mounted in DPX.

Cell culture.

Human VSMC were purchased from ATCC (CRL-1999) and maintained in HAM's F12 (BioWittaker) supplemented with 10% FBS (BioWittaker), 2mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin (Invitrogen). Cells were used between passages 3 and 7. For experiments, cells were preincubated with 0% FBS during 24h.

Reagents.

Human recombinant CypA was purchased from Enzo. Nitrotetrazolium Blue Chloride (NBT), H₂O₂ 30% (w/w) in H₂O solution were obtained from Sigma.

ROS measurement.

Superoxide anion production was measured by the assay of NBT reduction to diformatan as described in (20). Twenty-four h starved hVSMC cells were stimulated with CypA and/or H₂O₂ at different times. The optical density (OD) of the wells was determined using a microplate reader (Infinite F200, TECAN) at a test wavelength of 525 nm, using dioxane as the blank. The relative stimulation was calculated by giving a value of 1 to the absorbance obtained in the non-stimulated samples.

Statistical analysis.

Results from *in vitro/ex vivo* studies are expressed as mean \pm SEM and were analyzed by t-test or Wilcoxon paired test (between thrombus and media supernatants of the same samples). Results from plasma are expressed as median (interquartile ranges, IQR) and were analyzed by the ANOVA test. A p value <0.05 was considered statistically significant.

RESULTS

Cyclophilin A concentrations in plasma of AAA patients.

Previous studies have shown that intracellular cyclophilin A is associated to AAA pathogenesis (21). However, although CypA was initially believed to function primarily as an intracellular protein, recent studies have revealed that it can be secreted by cells in response to ROS. We aimed to analyze whether circulating levels of CypA could be a biomarker of AAA progression. We have shown that circulating CypA concentrations are significantly increased in the plasma of patients with small AAA (AAA diameter=3-5 cm, n=37) relative to large AAA (AAA diameter>5cm, n=40) [115(85-180) vs. 79(54-102) ng/ml, p<0.001, **Figure 1**]. Moreover, CypA plasma levels negatively correlated with AAA size (ρ =-0.3, p<0.05).

Cyclophilin A in AAA tissue-conditioned media.

We have analyzed the levels of CypA in conditioned medium of AAA thrombus and arterial wall, as well as in healthy aortic media layer. CypA levels were decreased in the conditioned medium of intraluminal thrombus (ILT) of AAA relative to that obtained from the media layer [(thrombus: luminal=1013 \pm 226 vs.

abluminal=209±73 a.u., $p<0.05$) vs. pathological media 2087±210 a.u., $p<0.05$, **Figure 2**]. Finally, CypA levels were significantly decreased in the conditioned media of pathological wall compared to healthy aortic media (2087±210 vs. 2735±363 a.u., $p<0.05$, **Figure 2**).

Cyclophilin A in AAA tissue and healthy aorta.

Detection of CypA in AAA samples and healthy aorta was achieved by immunohistochemistry (**Figure 3**). Positive staining was observed in the luminal part of the thrombus, associated with polymorphonuclear cells (probably neutrophils). A stronger staining was observed in media wall and healthy aorta associated to VSMC.

Cyclophilin A regulates ROS production in human VSMC under pro-oxidant conditions.

ROS production was analyzed in human VSMC stimulated with rhCypA (10 nM) during 90 minutes (**Figure 4**). Human VSMCs were also co-incubated with H_2O_2 during 60 min after 30 min of pre-incubation with CypA. Basal superoxide production was not changed in the presence of CypA (Control=1.0±0.1 vs. CypA 10nM=0.98±0.26 fold vs. control). H_2O_2 significantly increased superoxide production compare with its control (1.0±0.1 vs. 2.34±0.70 fold vs. control, $p<0.05$), which was diminished by CypA preincubation (2.34±0.70 vs. CypA 10nM=1.56±0.41 fold vs. control, $p<0.05$). Similar results were obtained when rhCypA was incubated 24h and then cells were stimulated for 60 min with H_2O_2 (data not shown).

DISCUSSION:

The aim of this study was to analyze the role of extracellular CypA in human AAA. The main findings of the present study are: first, CypA concentrations are increased in plasma of patients with small AAA compared to patients with large AAA. Second, CypA is mainly released and expressed by VSMC in the pathological media layer, but in a lesser extent that in the normal aortic tissue. Third, extracellular CypA decreases superoxide production induced by H_2O_2 in cultured human VSMC.

While most of the published studies analyzing the role of CypA in cardiovascular diseases are based in cell lines and/or animal models, there are few data regarding its potential role as a circulating biomarker in humans.

There is only one study that compares CypA protein levels in the plasma of postmenopausal women who suffered stroke vs. healthy women, showing an increased expression in postmenopausal group and a positive correlation with stroke risk (22). In our case, we have found that CypA is decreased in the plasma of patients with small AAA compared to large AAA with similar risk factors and medications, suggesting that the decrease in CypA plasma levels observed in large AAA patients could be associated with the progression of the disease. In this respect, the pattern of CypA expression is different to that of other oxidative stress-induced factors, such as thioredoxin (TRX) or peroxiredoxin-1 (PRX-1), which are increased in large AAA patients (23,24). However, it is important to remember that TRX and PRX-1 were expressed by leukocytes and red blood cells, present in the luminal part of the thrombus, while CypA is mainly produced by VSMCs.

Since AAA evolution is characterized by vascular wall remodeling mainly due to proteolysis and subsequent thrombus formation, it could be hypothesized that the first antioxidant response requires VSMC response (characterized by CypA secretion) and secondly, a thrombus response (characterized by TRX and PRX release). In any case, the final redox balance depends both on antioxidant systems and pro-oxidant molecules. In this respect, previous studies have shown increased levels of malondialdehyde, a degradation product of polyunsaturated lipids mediated by ROS (25), while decreased concentration of the antioxidant vitamin E(26). More recently, we have further demonstrated that systemic redox balance is disturbed in AAA patients, showing increased levels of myeloperoxidase and decreased levels of catalase (27). Further studies in larger patient cohorts will be needed to confirm the potential value of CypA as a circulating biomarker of AAA progression.

Going further on the analysis of extracellular CypA, we have analyzed the levels of CypA in conditioned medium obtained after culture of AAA tissue samples (thrombus and wall) and healthy wall. CypA levels were increased in healthy aortic media compared to pathological media. When we analyzed by immunohistochemistry the localization of CypA, we found that CypA expression was present in the luminal area of the thrombus, associated to PMN infiltration. However, we observed that VSMCs present in both pathological and healthy media are the main producers of CypA. Our results are in agreement with a previous study where CypA was highly expressed throughout the aortic wall of AAA lesions (21). In this regard, the increased levels of extracellular CypA could be related to its intracellular levels. Since the main producers of CypA are the VSMC, differences in extracellular CypA levels observed between pathological AAA and healthy media could be related to the number of “normal” VSMC. In this respect, one of the main characteristics of the pathological AAA wall is the depletion of VSMC (28, 29).

Although our observational study can not rule out the role of extracellular CypA levels in AAA, it could be hypothesized that the diminution of VSMC by apoptosis observed during AAA expansion (30) could be associated to a reduced capacity to secrete CypA in the later stages of AAA evolution, characterized by lower levels of plasma CypA. However, we could not ascertain whether other sources of CypA release (e.g. circulating cells) or degradation (proteases) could also contribute to CypA plasma levels.

The role of extracellular CypA modulating ROS production has been studied in many pathologies and cell types showing different relationships. We observed that in human VSMC, rhCypA can decrease ROS production induced by H_2O_2 . In agreement, CypA can act as a ROS scavenger or as an inducer of the antioxidant response as previously described with *in vitro* proteins and in human T-cells or VSMCs (31-34). This anti-oxidative response was dependent on the presence of a pro-oxidant stimulus but it was neither time nor CypA dose-dependent. Satoh *et al.* (21) showed that rhCypA produced a ROS increment in VSMC and the animal models developed for chronic overexpression or depletion of CypA indicated that CypA worsen the development of AAA (21). In contrast, a protective role for CypA has been proved against ROS in myoblast, cardiomyocytes and in a cell model of Alzheimer disease, among others (35-37). It has been

described that CypA is capable to desensitize cancer cells to hypoxia- and cisplatin-induced cell death by suppression of ROS increase and loss of mitochondrial membrane potential modulation (38). It has been even proved that endothelial cells respond in a biphasic dose-dependent fashion to extracellular rhCypA, activating endothelial cells at low doses (10nM), but inducing endothelial dysfunction at high doses (100nM). This divergence may be explained by the different models studied and by the purity of the rhCypA preparations used in the previous work since it has been proved that endotoxin contamination may blur the effects mediated by CypA (39) as LPS induces ROS in VSMC (40). In this work rhCypA was tested, as previously recommended (39). Although in this work we have not measured the CypA concentration in the tissue and how it affects to other cell types, such as endothelial cells, we have shown that the bigger concentration of CypA in plasma, founding small AAA samples, varies up to 16 nM in the worst case, such concentration is 6 times lower than the one needed to induce endothelial dysfunction.

In conclusion, we have shown decreased circulating levels of CypA in large AAA patients and decrease release of CypA by pathological vascular wall, suggesting that diminution of CypA is associated with AAA progression. Finally, a protective antioxidant effect of extracellular CypA has been observed in VSMC in vitro, although assessment of the biological role of extracellular CypA and its use as potential target will require additional studies.

ACKNOWLEDGMENT.

The paper have been supported by the EC, FAD project (FP-7, HEALTH F2-2008-200647), the Spanish MICIN (SAF2010/21852), Ministerio de Sanidad y Consumo, Instituto de Salud Carlos III, (PI10/00072), Redes RECAVA (RD06/0014/0035) and RETIC (RD09/0076/00101).

REFERENCES.

1. Sakalihasan, N., Limet, R., and Defawe, O. D. Abdominal aortic aneurysm., *Lancet* 365, 1577–1589 (2005).
2. Michel, J.-B., Martin-Ventura, J.-L., Egido, J., Sakalihasan, N., Treska, V., Lindholt, J., Allaire, E., Thorsteinsdottir, U., Cockerill, G., Swedenborg, J., FAD EU consortium. Novel aspects of the pathogenesis of aneurysms of the abdominal aorta in humans., *Cardiovasc. Res.* 90, 18–27 (2011).
3. Miller, F. J., Sharp, W. J., Fang, X., Oberley, L. W., Oberley, T. D., and Weintraub, N. L. Oxidative stress in human abdominal aortic aneurysms: a potential mediator of aneurysmal remodeling., *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 22, 560–565 (2002).
4. Galat, A., and Bua, J. Molecular aspects of cyclophilins mediating therapeutic actions of their ligands., *Cell. Mol. Life Sci.* 67, 3467–3488 (2010).
5. Handschumacher, R. E., Harding, M. W., Rice, J., Drugge, R. J., and Speicher, D. W. Cyclophilin: a specific cytosolic binding protein for cyclosporin A., *Science* 226, 544–547 (1984).

6. Takahashi, N., Hayano, T., and Suzuki, M. Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase is the cyclosporin A-binding protein cyclophilin., *Nature*337, 473–475 (1989).
7. Liu, J., Farmer, J. D., Lane, W. S., Friedman, J., Weissman, I., and Schreiber, S. L. Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes., *Cell*66, 807–815 (1991).
8. Yao, Q., Li, M., Yang, H., Chai, H., Fisher, W., and Chen, C. Roles of cyclophilins in cancers and other organ systems., *World J Surg*29, 276–280 (2005).
9. Yang, Y., Lu, N., Zhou, J., Chen, Z.-N., and Zhu, P. Cyclophilin A up-regulates MMP-9 expression and adhesion of monocytes/macrophages via CD147 signalling pathway in rheumatoid arthritis., *Rheumatology (Oxford)*47, 1299–1310 (2008).
10. Uittenbogaard, A., Ying, Y., and Smart, E. J. Characterization of a cytosolic heat-shock protein-caveolin chaperone complex. Involvement in cholesterol trafficking., *J. Biol. Chem.*273, 6525–6532 (1998).
11. Garvey, S. M., Sinden, D. S., Schoppee Bortz, P. D., and Wamhoff, B. R. Cyclosporine up-regulates Krüppel-like factor-4 (KLF4) in vascular smooth muscle cells and drives phenotypic modulation in vivo., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*333, 34–42 (2010).
12. Lee, J. Role of cyclophilin a during oncogenesis., *Arch. Pharm. Res.*33, 181–187 (2010).
13. Nigro, P., Satoh, K., O'Dell, M. R., Soe, N. N., Cui, Z., Mohan, A., Abe, J.-I., Alexis, J. D., Sparks, J. D., and Berk, B. C. Cyclophilin A is an inflammatory mediator that promotes atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice., *J. Exp. Med.*208, 53–66 (2011).
14. Zhu, C., Wang, X., Deinum, J., Huang, Z., Gao, J., Modjtahedi, N., Neagu, M. R., Nilsson, M., Eriksson, P. S., Hagberg, H., Luban, J., Kroemer, G., and Blomgren, K. Cyclophilin A participates in the nuclear translocation of apoptosis-inducing factor in neurons after cerebral hypoxia-ischemia., *J. Exp. Med.*204, 1741–1748 (2007).
15. Liao, D. F., Jin, Z. G., Baas, A. S., Daum, G., Gygi, S. P., Aebersold, R., and Berk, B. C. Purification and identification of secreted oxidative stress-induced factors from vascular smooth muscle cells., *J. Biol. Chem.*275, 189–196 (2000).
16. Song, F., Zhang, X., Ren, X.-B., Zhu, P., Xu, J., Wang, L., Li, Y.-F., Zhong, N., Ru, Q., Zhang, D.-W., Jiang, J.-L., Xia, B., and Chen, Z.-N. Cyclophilin A (CyPA) induces chemotaxis independent of its peptidylprolyl cis-trans isomerase activity: direct binding between CyPA and the ectodomain of CD147., *J. Biol. Chem.*286, 8197–8203 (2011).
17. Tegeder, I., Schumacher, A., John, S., Geiger, H., Geisslinger, G., Bang, H., and Brune, K. Elevated serum cyclophilin levels in patients with severe sepsis., *J. Clin. Immunol.*17, 380–386 (1997).

18. Kim, H., Kim, W.-J., Jeon, S.-T., Koh, E.-M., Cha, H.-S., Ahn, K.-S., and Lee, W.-H. Cyclophilin A may contribute to the inflammatory processes in rheumatoid arthritis through induction of matrix degrading enzymes and inflammatory cytokines from macrophages., *Clin. Immunol.*116, 217–224 (2005).
19. Caligiuri, G., Rossignol, P., Julia, P., Groyer, E., Mouradian, D., Urbain, D., Misra, N., Ollivier, V., Sapoval, M., Boutouyrie, P., Kaveri, S. V., Nicoletti, A., and Lafont, A. Reduced immunoregulatory CD31+ T cells in patients with atherosclerotic abdominal aortic aneurysm., *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*26, 618–623 (2006).
20. Aukrust, P., Müller, F., and Frøland, S. S. Enhanced generation of reactive oxygen species in monocytes from patients with common variable immunodeficiency., *Clin. Exp. Immunol.*97, 232–238 (1994).
21. Satoh, K., Nigro, P., Matoba, T., O'Dell, M. R., Cui, Z., Shi, X., Mohan, A., Yan, C., Abe, J.-I., Illig, K. A., and Berk, B. C. Cyclophilin A enhances vascular oxidative stress and the development of angiotensin II-induced aortic aneurysms., *Nat. Med.*15, 649–656 (2009).
22. Prentice, R. L., Paczesny, S., Aragaki, A., Amon, L. M., Chen, L., Pitteri, S. J., McIntosh, M., Wang, P., Buson Busald, T., Hsia, J., Jackson, R. D., Rossouw, J. E., Manson, J. E., Johnson, K., Eaton, C., and Hanash, S. M. Novel proteins associated with risk for coronary heart disease or stroke among postmenopausal women identified by in-depth plasma proteome profiling., *Genome Med*2, 48 (2010).
23. Martinez-Pinna, R., Ramos-Mozo, P., Madrigal-Matute, J., Blanco-Colio, L. M., Lopez, J. A., Calvo, E., Camafeita, E., Lindholt, J. S., Meilhac, O., Delbosc, S., Michel, J.-B., de Ceniga, M. V., Egido, J., and Martin-Ventura, J. L. Identification of peroxiredoxin-1 as a novel biomarker of abdominal aortic aneurysm., *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*31, 935–943 (2011).
24. Martinez-Pinna, R., Lindholt, J. S., Blanco-Colio, L. M., Dejouvencel, T., Madrigal-Matute, J., Ramos-Mozo, P., Vega de Ceniga, M., Michel, J. B., Egido, J., Meilhac, O., and Martin-Ventura, J. L. Increased levels of thioredoxin in patients with abdominal aortic aneurysms (AAAs). A potential link of oxidative stress with AAA evolution., *Atherosclerosis*212, 333–338 (2010).
25. Papalambros, E., Sigala, F., Georgopoulos, S., Paraskevas, K. I., Andreadou, I., Menenakos, X., Sigalas, P., Papalambros, A. L., Vourliotakis, G., Giannopoulos, A., Bakoyiannis, C., and Bastounis, E. Malondialdehyde as an indicator of oxidative stress during abdominal aortic aneurysm repair., *Angiology*58, 477–482 (2007).
26. Sakalihasan, N., Pincemail, J., Defraigne, J. O., Nusgens, B., Lapiere, C., and Limet, R. Decrease of plasma vitamin E (alpha-tocopherol) levels in patients with abdominal aortic aneurysm., *Ann. N. Y. Acad. Sci.*800, 278–282 (1996).

27. Ramos-Mozo, P., Madrigal-Matute, J., Martinez-Pinna, R., Blanco-Colio, L. M., Antonio Lopez, J., Camafeita, E., Meilhac, O., Michel, J.-B., Aparicio, C., de Ceniga, M. V., Egido, J., and Martin-Ventura, J.-L. Proteomic Analysis of Polymorphonuclear Neutrophils Identifies Catalase as a Novel Biomarker of Abdominal Aortic Aneurysm., *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol* (2011).
28. Henderson, E. L., Geng, Y. J., Sukhova, G. K., Whittemore, A. D., Knox, J., and Libby, P. Death of smooth muscle cells and expression of mediators of apoptosis by T lymphocytes in human abdominal aortic aneurysms., *Circulation*99, 96–104 (1999).
29. López-Candales, A., Holmes, D. R., Liao, S., Scott, M. J., Wickline, S. A., and Thompson, R. W. Decreased vascular smooth muscle cell density in medial degeneration of human abdominal aortic aneurysms., *Am. J. Pathol.*150, 993–1007 (1997).
30. Rowe, V. L., Stevens, S. L., Reddick, T. T., Freeman, M. B., Donnell, R., Carroll, R. C., and Goldman, M. H. Vascular smooth muscle cell apoptosis in aneurysmal, occlusive, and normal human aortas., *J. Vasc. Surg.*31, 567–576 (2000).
31. Jäschke, A., Mi, H., and Tropschug, M. Human T cell cyclophilin18 binds to thiol-specific antioxidant protein Aop1 and stimulates its activity., *J. Mol. Biol.*277, 763–769 (1998).
32. Lee, S. P., Hwang, Y. S., Kim, Y. J., Kwon, K. S., Kim, H. J., Kim, K., and Chae, H. Z. Cyclophilin a binds to peroxiredoxins and activates its peroxidase activity., *J. Biol. Chem.*276, 29826–29832 (2001).
33. Takapoo, M., Chamseddine, A. H., Bhalla, R. C., and Miller, F. J. Glutathione peroxidase-deficient smooth muscle cells cause paracrine activation of normal smooth muscle cells via cyclophilin A., *Vascul Pharmacol.*(2011).
34. Gourlay, L. J., Angelucci, F., Baiocco, P., Boumis, G., Brunori, M., Bellelli, A., and Miele, A. E. The three-dimensional structure of two redox states of cyclophilin A from *Schistosoma mansoni*. Evidence for redox regulation of peptidyl-prolyl cis-trans isomerase activity., *J. Biol. Chem.*282, 24851–24857 (2007).
35. Ge, Y.-S., Teng, W.-Y., and Zhang, C.-D. Protective effect of cyclophilin A against Alzheimer's amyloid beta-peptide (25-35)-induced oxidative stress in PC12 cells., *Chin. Med. J.*122, 716–724(2009).
36. Doyle, V., Virji, S., and Crompton, M. Evidence that cyclophilin-A protects cells against oxidative stress., *Biochem. J.*341 (Pt 1), 127–132 (1999).
37. Hong, F., Lee, J., Song, J.-W., Lee, S. J., Ahn, H., Cho, J. J., Ha, J., and Kim, S. S. Cyclosporin A blocks muscle differentiation by inducing oxidative stress and inhibiting the peptidyl-prolyl-cis-trans isomerase activity of cyclophilin A: cyclophilin A protects myoblasts from cyclosporin A-induced

- cytotoxicity., *FASEB J.*16, 1633–1635 (2002).
38. Choi, K. J., Piao, Y. J., Lim, M. J., Kim, J. H., Ha, J., Choe, W., and Kim, S. S. Overexpressed cyclophilin A in cancer cells renders resistance to hypoxia- and cisplatin-induced cell death., *Cancer Res.*67, 3654–3662 (2007).
 39. Payeli, S. K., Schiene-Fischer, C., Steffel, J., Camici, G. G., Rozenberg, I., Lüscher, T. F., and Tanner, F. C. Cyclophilin A differentially activates monocytes and endothelial cells: role of purity, activity, and endotoxin contamination in commercial preparations., *Atherosclerosis*197, 564–571 (2008).
 40. Heo, S.-K., Yi, H.-S., Yun, H.-J., Ko, C.-H., Choi, J.-W., and Park, S.-D. Ethylacetate extract from *Draconis Resina* inhibits LPS-induced inflammatory responses in vascular smooth muscle cells and macrophages via suppression of ROS production., *Food Chem. Toxicol.*48, 1129–1136 (2010).

FIGURE LEGENDS:

Figure 1.-Cyclophilin A plasma levels in AAA patients.

ELISA of CypA in small (n=37) and large AAA patients (n=40), *p<0.001 for small AAA vs. large AAA.

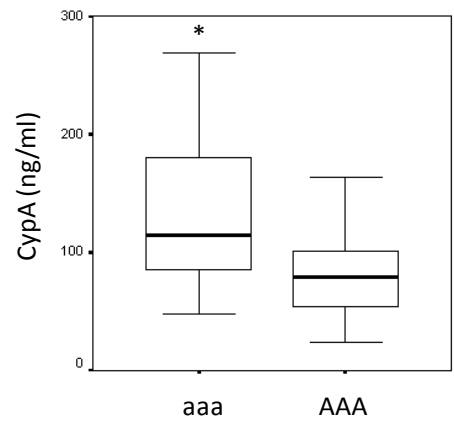


FIGURE 1

Figure 2.-Cyclophilin A in AAA thrombus-conditioned media.

Western-blot of 4 different patients (P1-P4) and quantification of cyclophilin A levels in thrombus (L=luminal, A=abluminal) and wall (M) of AAA (n=10), as well as in healthy media (H, n=10). (densitometric arbitrary units (a.u.)) *p<0.05 L vs. A, M vs. L and H vs.M.

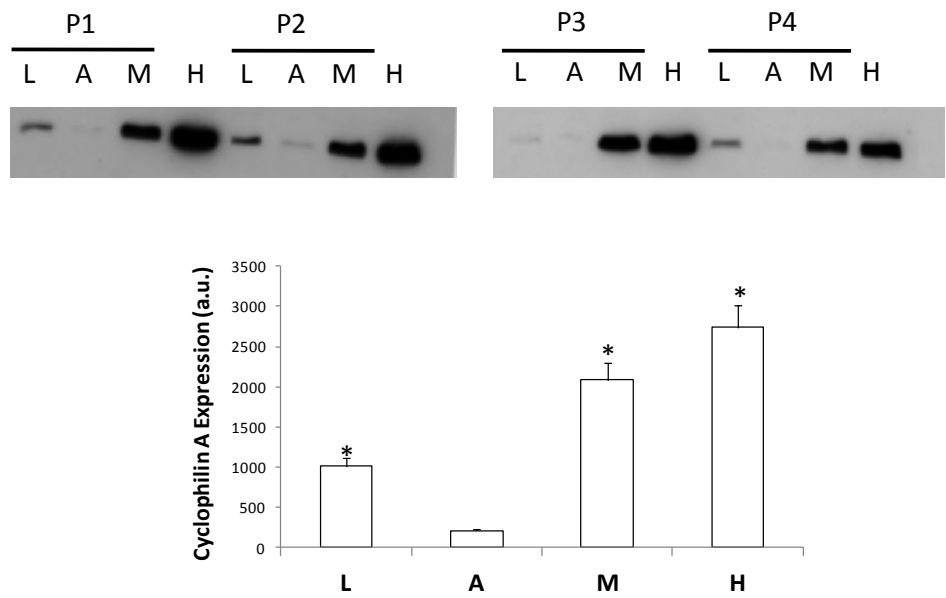
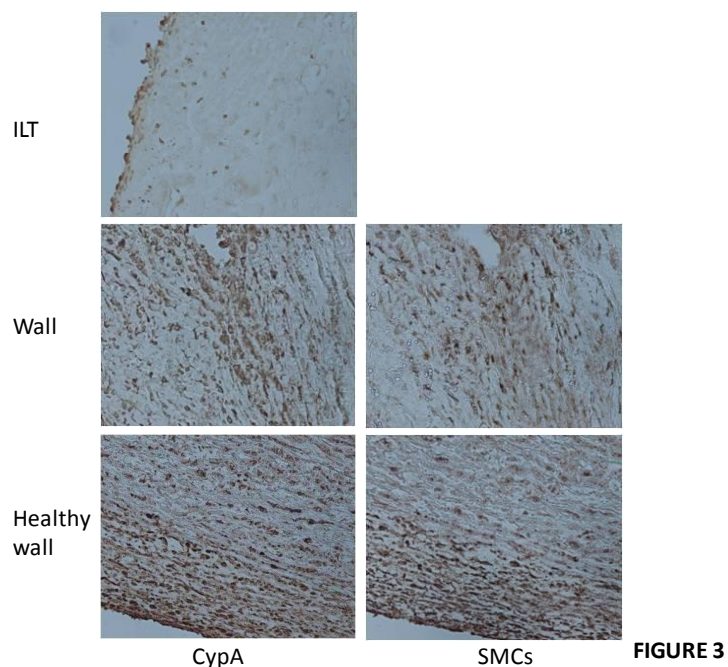


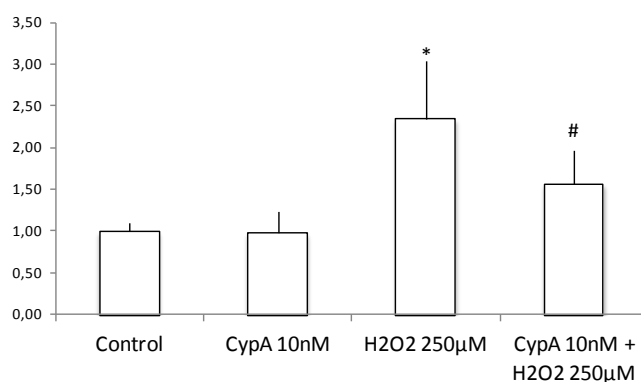
FIGURE 2

Figure 3.- Cyclophilin A in aortic tissue.

Immunodetection of CypA in the luminal part of the thrombus (ILT) and CypA and α -actin SMCs in both, AAA and healthy wall (Magnification 20X).

**FIGURE 3****Figure 4.- ROS levels in hVSMC cultures.**

Relative production of $O_2^{\cdot -}$ is increased under $250\mu M$ H_2O_2 stimulation for 60 min, but with 30 min of CypA pre-incubation (10nM) ROS production was significantly reduced; $n=3$. * $p<0.05$ vs. Control; # $p<0.05$ vs. H_2O_2 .

**FIGURE 4**

TABLES: Table 1.- Clinical characteristics of AAA patients.

	Small AAA patients (n=37)	Large AAA patients (n=40)
Age (years)	73±8	71±9
Sex (Male/Female)	33(93%) /4 (11%)	39 (97%) /1 (3%)
Active smoking	10/37 (27%)	15/40 (38%)
Hypertension	27/37 (73%)	18/40(45%)
Diabetes mellitus	9/37(24%)	7/40 (18%)
Hypercholesterolemia	19/37 (51%)	24/40 (60%)
Cardiac disease	6/37 (16%)	6/40 (15%)
Diameter (mm)	39±6	61±10
Age (years)	73±8	71±9
Sex (Male/Female)	33(93%) /4 (11%)	39 (97%) /1 (3%)
Active smoking	10/37 (27%)	15/40 (38%)
Hypertension	27/37 (73%)	18/40(45%)
Diabetes mellitus	9/37(24%)	7/40 (18%)
Hypercholesterolemia	19/37 (51%)	24/40 (60%)
Cardiac disease	6/37 (16%)	6/40 (15%)
Diameter (mm)	39±6	61±10

7. Incremento de los niveles plasmáticos de NGAL, un marcador de activación de neutrófilos, en pacientes con aneurisma de aorta abdominal.

En este estudio abordamos el objetivo 3c. Habíamos observado anteriormente en el proteoma diferencial de PMNs que los niveles de NGAL se encuentran elevados en PMNs circulantes de pacientes con AAA respecto a un grupo control. Siguiendo esta línea de investigación el siguiente objetivo que nos propusimos fue si las concentraciones de NGAL circulantes reflejan una activación de neutrófilos en pacientes con AAA.

NGAL fue aislada originalmente como una proteína derivada de neutrófilos (Kjeldsen, L., 1993) que representan un papel importante durante el proceso inflamatorio (Kjeldsen, L., 2000). Las concentraciones en plasma de NGAL han sido relacionadas con factores de riesgo cardiovascular en pacientes con aterosclerosis asintomática (Elneihoum, A.M., 1997.) Se han observado niveles elevados de NGAL en el suero de pacientes con enfermedad arterial coronaria e insuficiencia cardíaca crónica (Zografos, T., 2009) (Yndestad, A., 2009). Las concentraciones en plasma de NGAL han sido relacionadas con marcadores de función renal en pacientes con aterosclerosis, sugiriendo que los niveles de NGAL podría reflejar un vínculo entre ambas patologías (Giaginis, C., 2010). Aunque la presencia de NGAL ha sido previamente observada en tejido humano de AAA, en ningún estudio se ha analizado la asociación de NGAL circulante con AAA (Folkesson, M., 2007).

Analizamos en primer lugar la liberación de NGAL por PMNs en tejido humano de AAA. En segundo lugar se midieron las concentraciones de NGAL en el plasma en relación a la presencia, tamaño y crecimiento de los AAA, los resultados obtenidos mostraban un aumento de NGAL secretada por PMNs de pacientes, así como la presencia de NGAL en la capa luminal del trombo asociada a células polimorfonucleares. También observamos un aumento de NGAL en el plasma de pacientes con respecto a los controles sanos, y una correlación positiva entre la concentración de NGAL y el tamaño y progresión del aneurisma.

Por ello podemos pensar que NGAL es un marcador de activación de neutrófilos en pacientes con AAA. Y especulamos que el reclutamiento de PMNs en el ILT y la liberación de NGAL sea una respuesta a las bacterias presentes en el ILT (Delbosc, S., 2011). Nuestro estudio no puede excluir la posibilidad de que el aumento de los niveles de NGAL también podría ser, al menos en parte, consecuencia de una respuesta al aumento de los niveles de MMP-9.



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Atherosclerosis

journal homepage: www.elsevier.com/locate/atherosclerosis

Increased plasma levels of NGAL, a marker of neutrophil activation, in patients with abdominal aortic aneurysm

Priscila Ramos-Mozo^a, Julio Madrigal-Matute^a, Melina Vega de Ceniga^b, Luis Miguel Blanco-Colio^a, Olivier Meilhac^c, Laurent Feldman^c, Jean-Baptiste Michel^c, Paula Clancy^d, Jonathan Golledge^d, Paul E. Norman^e, Jesus Egido^a, José Luis Martin-Ventura^{a,*}

^a Vascular Research Lab, IIS, Fundación Jiménez Díaz, Autónoma University, Madrid, Spain

^b Vascular Surgery, Hospital Galdakao-Usansolo, Bilbao, Spain

^c Inserm, U698, Univ Paris 7, CHU X-Bichat, Paris, France

^d Vascular Biology Unit, School of Medicine and Dentistry, James Cook University, Townsville 4811, Australia

^e School of Surgery, University of Western Australia, Perth, Australia

ARTICLE INFO

Article history:

Received 18 May 2011

Received in revised form 26 October 2011

Accepted 16 November 2011

Available online 25 November 2011

Keywords:

Abdominal aortic aneurysm

Biomarkers

Polymorphonuclear neutrophils

Neutrophil gelatinase-associated lipocalin

Intraluminal thrombus

ABSTRACT

Objective: Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) plasma concentrations have been associated with cardiovascular diseases. We aimed to assess the association of NGAL with abdominal aortic aneurysm (AAA).

Methods: NGAL concentrations were analyzed by Western blotting in conditioned medium of polymorphonuclear neutrophils (PMNs) from AAA patients ($n = 22$) and controls ($n = 11$), and also in aortic biopsies from AAA patients and healthy controls ($n = 10$). Plasma NGAL concentrations were measured by ELISA in three groups of subjects from France ($n = 60$), Spain ($n = 75$) and Australia ($n = 100$) and associated with AAA presence and growth.

Results: PMNs isolated from AAA patients secreted significantly greater amounts of NGAL than PMNs from controls. Luminal thrombus released large amounts of NGAL compared to abluminal AAA thrombus, AAA wall and healthy aortic media. Plasma NGAL concentrations were significantly higher in patients with AAA than controls from France [115 (78–200) vs. 94 (72–114) ng/ml, $p < 0.001$]. NGAL plasma concentrations in AAA patients from Spain correlated with other markers of thrombus activity (plasmin–antiplasmin complexes and D-dimer). Furthermore, a positive correlation between plasma NGAL and retrospective AAA growth ($\rho = 0.4$, $p = 0.01$) was observed, which remained significant after adjusting for other risk factors. Plasma NGAL was only weakly associated with prospective growth in both Spanish and Australian patients.

Conclusions: NGAL is released by PMNs and by the luminal part of AAA thrombus. NGAL plasma levels were increased in AAA patients compared with healthy subjects and correlated with retrospective AAA growth. Further studies in larger subjects groups are needed to confirm the association between NGAL and AAA presence and growth.

© 2011 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Abdominal aortic aneurysm (AAA) is an important health problem in the elderly. In cross-sectional studies the prevalence of AAA varies from 3% to 8% in men aged >65 years. In elderly men AAA may cause as much as 2–3% of all deaths [1].

Human AAAs are characterized by the presence of intraluminal thrombus (ILT), an important source of proteolytic and oxidative enzymes implicated in AAA [2,3]. Polymorphonuclear neutrophils (PMNs), along with platelets and red blood cells, are particularly abundant within the luminal layer of AAA thrombus. PMNs may contribute to two main mechanisms of AAA evolution, namely medial destruction and adventitial immune-inflammatory processes [4,5]. A role for PMNs in the pathogenesis of AAA is supported by recent studies in animal models of AAA [6,7]. PMN depletion is able to inhibit experimental AAA formation [7] and short-term preoperative doxycycline therapy improves the proteolytic balance in human AAA, possibly through limiting aortic wall neutrophil

* Corresponding author at: Vascular Research Lab, IIS, Fundación Jiménez Díaz, Autónoma University, Av. Reyes Católicos 2, 28040 Madrid, Spain.
Tel.: +34 915504800; fax: +34 915442636.

E-mail address: jlmartin@fjd.es (J.L. Martin-Ventura).

infiltration [8]. This data highlights the potential value of analyzing PMNs as a source of AAA biomarkers.

Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) was originally isolated as a neutrophil-derived protein [9] and these cells have been found to represent an important source for circulating NGAL during inflammation [10]. Plasma NGAL concentrations have been correlated to cardiovascular risk factors in patients with asymptomatic atherosclerosis [11]. Serum NGAL concentrations have been reported to be significantly higher in patients with coronary artery disease (CAD) and chronic heart failure (CHF), and correlated with the severity of the disease [12,13]. Very recently, NGAL plasma concentrations have been correlated with markers of renal function (e.g. creatinine) in patients with carotid atherosclerosis, suggesting that NGAL levels could reflect a potential link between both pathologies [14]. Although the presence of NGAL has been previously observed in human AAA tissue [15], no studies have analyzed the association of circulating NGAL concentrations with AAA. Our hypothesis was that circulating NGAL concentrations would reflect leukocyte activation in patients with AAA. To assess this hypothesis, we first analyzed NGAL release by PMNs and human AAA tissue. Secondly, we measured NGAL concentrations in the plasma of three groups of patients and related them to the presence, size and growth of AAAs.

2. Materials and methods

2.1. AAA patients

2.1.1. French subjects

Plasma was obtained from patients ($n=30$) undergoing AAA surgery and enrolled in the RESAA protocol (Réflet Sanguin de l'évolutivité des Anévrismes de l'Aorte abdominale) (Table 1 online). All patients gave informed written consent, and the protocol was approved by a French ethics committee (Comité Consultatif de Protection des Personnes dans la Recherche Biomedicale, CCPRB Paris-Cochin, approval no 2095) [16].

Control subjects were a sub-group of the BIOmarkers of CORonary Events (BIOCORE) – 1 study (ClinicalTrials.gov identifier: NCT00430820). Subjects ($n=30$) selected required a normal coronary angiography and had no documented AAA. Subjects were age and sex matched with the AAA patients.

2.1.2. Spanish subjects

Plasma samples were obtained from 75 patients with infrarenal AAAs (AAA size > 30 mm) recruited from Galdakao Hospital (Table 2 online). More information regarding these patients can be found in the online supplement data. We registered the maximum aortic diameter at the time of blood sample harvest and AAA growth in the previous 12 months (retrospective 1-year AAA growth = AAA diameter at the time of blood sample harvest – AAA diameter 1 year previously). We prospectively followed the patients with annual ultrasound scanning (if the baseline AAA diameter was 3–3.9 cm), or with six-monthly abdominal contrast CT scan (if the baseline AAA diameter was 4–4.9 cm). We calculated the prospective 1-year AAA growth as: AAA diameter 1 year after blood sample harvest – AAA diameter at the time of blood sample harvest.

2.1.3. Australian subjects

Australian subjects were recruited from the Health in Men Study (HIMS), which has been described in detail in a previous publication [17]. This cohort includes men who took part in a trial of ultrasound screening for AAA of whom a sub-set later returned for blood sampling. We included 100 men with AAA (aortic diameter ≥ 30 mm) for whom ultrasound surveillance of their aneurysm was available (Table 3 online). The annual growth rates of AAAs were assessed by taking into account all diameters measured during follow-up and

calculating time-weighted average growth rates for each patient [18].

All studies were approved by the corresponding Scientific Ethical Committees, and informed consent from the patients was obtained.

2.2. Neutrophil-conditioned media

Blood samples were obtained from an additional 22 AAA patients and 11 controls matched by age and sex from Spain. Neutrophils were obtained from venous blood by Ficoll-Paque (Amersham, Piscataway, NJ, USA) followed by 6% dextran sedimentation and hypo-osmotic lysis of residual erythrocytes. PMNs isolation was assessed by flow cytometry to make sure that they were not contaminated by others cell types. The analysis of CD16 from PMNs shows a strong fluorescence signal in all samples (not shown). One million PMNs isolated from blood samples were cultured in RPMI medium and proteins released were obtained after 30 min of culture.

2.3. AAA tissue and tissue-conditioned media

Ten AAA thrombus samples were collected during surgical repair and dissected into luminal and abluminal parts (respectively at the interface with circulating blood and with the remaining media). AAA samples were obtained from patients undergoing surgery, enrolled in the RESAA protocol [16]. Ten control aortas were sampled from dead organ donors with the authorization of the French Biomedicine Agency (PFS 09-007). These control aortic samples were macroscopically normal and devoid of early atheromatous lesions. Different layers of AAA thrombus and wall, as well as healthy walls, were cut into small pieces (5 mm²) and separately incubated in RPMI 1640 medium containing antibiotics and an antimycotic (Gibco) for 24 h at 37 °C (6 ml/g of wet tissue). The conditioned medium (supernatant containing proteins released by the tissue sample) was obtained after centrifugation at 3000 × *g* for 10 min at 20 °C.

2.4. Western blotting

Equal amounts (5 µL) of conditioned medium (previously normalized to tissue weight: 1 g/6 mL) were electrophoresed as described [19]. The membranes were incubated with monoclonal antibodies against lipocalin-2/NGAL antibody (1:1000; R&D system). After they were incubated with HRP (horseradish peroxidase)-conjugated anti-goat IgG antibody (Santa Cruz) at a dilution of 1:2500. The proteins were then detected by enhanced chemiluminescence (ECL Western Blotting Detection Reagents, Amersham Biosciences) and evaluated by densitometry (Quantity One; Bio-Rad Laboratories). Pre-stained protein markers (PageRuler™ Prestained Protein Ladder; Fermentas) were used for molecular mass determinations.

2.5. ELISA

We quantified the soluble concentrations of NGAL (Bioporto diagnostics) in plasma and MPO (HYCULT) in conditioned media with commercial kits, following manufacturer's instructions.

2.6. Determination of cf-DNA

Cell-free DNA (cf-DNA) was considered as reflecting neutrophil extracellular trap (NET) formation. CF-DNA concentration was determined in the medium conditioned by neutrophils incubated for 30 min at 37 °C without stimulation using Quant-it™ Picogreen® ds DNA Reagent (Invitrogen, France). Supernatants

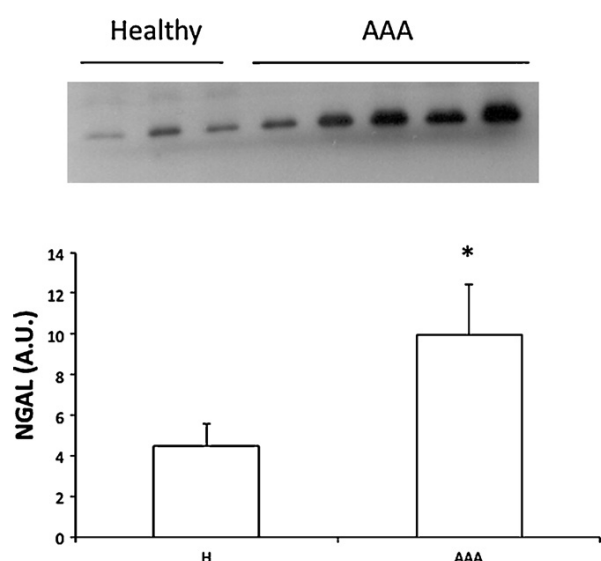


Fig. 1. NGAL levels in PMN-conditioned media of AAA patients and controls. Western-blot and quantification of NGAL levels in AAA patients ($n=22$) and controls ($H, n=11$). * $p<0.05$ vs. controls. AU=arbitrary units.

obtained after centrifugation ($1500 \times g$, 5 min, 20°C) were diluted 1:10 in TE buffer (200 mM Tris-HCl, 20 mM EDTA, pH 7.5, 100 μL final) before addition of 100 μL Picogreen® dsDNA reagent. The fluorescence was then measured using a microplate reader (excitation 480 nm, emission 520 nm) after mixing and incubation for 5 min at room temperature in the dark.

2.7. Statistical analysis

In vitro results are expressed as mean \pm standard error. The Wilcoxon paired test was used to analyze differences in NGAL levels between luminal, abluminal and media supernatants of

the same subjects. NGAL levels in AAA patients and controls are expressed as median (interquartile ranges) and were analyzed by the Mann-Whitney *U*-test. Univariate association was performed by Spearman correlation test. Multivariate linear regression analysis was conducted with AAA size or growth as dependent variables, including in the model the traditional risk factors and those variables that were significant in the univariate analysis. The statistical analysis was performed using the SPSS 15.0 software and $p<0.05$ as significant.

3. Experimental results

3.1. NGAL is released by PMN from AAA patients

The release of NGAL from PMNs isolated from AAA patients was significantly greater than from PMNs isolated from controls (9.9 ± 2.6 vs. 4.5 ± 1.2 a.u., $p<0.05$, Fig. 1). Similarly, MPO and Cf-DNA levels were also increased in conditioned media of PMN of AAA patients compared to controls assessed (96.8 ± 16.8 vs. 12.5 ± 5 ng/ml and 241 ± 13 vs. 225 ± 9 ng/ml, respectively, $p<0.05$ for both, not shown). A strong correlation was observed between NGAL and MPO or Cf-DNA ($r=0.5$ for both, $p<0.05$). These results suggest a potential activated state of circulating PMN in AAA patients.

3.2. NGAL is released by the luminal part of AAA thrombus

Since the luminal layer of ILT of human AAA is enriched in PMN, we analyzed the amount of NGAL in the conditioned media of explants of ILT, AAA wall, and healthy aortic wall. The amount of NGAL released was greatest from explants of the luminal layer of the ILT as compared to both abluminal thrombus and pathological AAA media (21.1 ± 7.9 vs. 11.1 ± 6.2 vs. 8.3 ± 4.9 a.u., $p<0.05$ for both, Fig. 2). Moreover, pathological media also release more NGAL than healthy media, where NGAL was almost absent (8.3 ± 4.9 vs. 2.1 ± 2.1 a.u., $p<0.05$, Fig. 2).

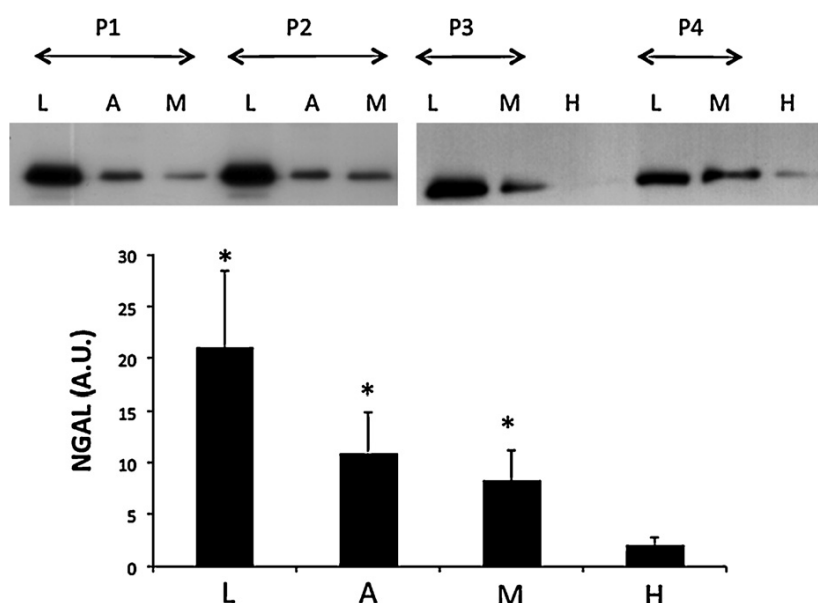


Fig. 2. NGAL levels in AAA and healthy tissue-conditioned media. Western-blot and quantification of NGAL levels in luminal (L), abluminal (A) and media (M) of AAA ($n=10$), as well as in healthy media (H, $n=10$). * $p<0.05$ L vs. A and M, A vs. M and M vs. H. Representative western blot of 4 thrombus of patients (P1–P4) and 2 healthy aortas. AU=arbitrary units.

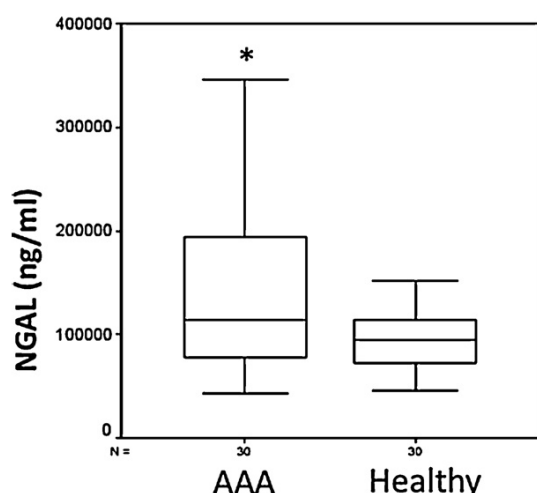


Fig. 3. NGAL plasma levels in AAA patients and healthy subjects. ELISA of NGAL in patients with AAA ($n=30$) and healthy controls ($n=30$) from France, * $p<0.001$ vs. controls.

3.3. Increased NGAL plasma levels in AAA patients and correlation with clinical and biological determinants of AAA activity

In French subjects circulating NGAL levels were significantly higher in AAA patients (AAA size > 50 mm, $n=30$) compared to control subjects ($n=30$) [115 (78–200) vs. 94 (72–114) ng/ml, $p<0.001$, Fig. 3]. This data was confirmed in 30 AAA patients (AAA size = 30–50 mm) and 30 age- and sex-matched control subjects from Spain [90 (79–113) vs. 80 (63–106), $p<0.05$, not shown]. To try to address the potential role of NGAL in AAA pathogenesis, we analyzed its association with AAA size in another group of plasma samples of AAA patients (AAA size > 30 mm, $n=75$) from Spain [109 (75–124) ng/ml]. Interestingly, NGAL levels and AAA diameter were significantly correlated ($r=0.27$, $p<0.05$), although significance disappears after multivariate analysis. In addition we analyzed the potential correlation of NGAL with markers associated to thrombus activity, such as myeloperoxidase (MPO), plasmin–antiplasmin complexes (PAP) and D-dimers (DD). NGAL levels correlated with MPO, PAP and DD (0.23, 0.25 and 0.28, respectively, $p<0.05$ for all). Furthermore, NGAL levels also correlated with leukocyte count and creatinine ($r=0.24$ and 0.56 respectively, $p<0.05$ for both). In a subset of patients ($n=40$) with data on retrospective and prospective 1-year growth, NGAL also correlated with retrospective 1-year growth ($r=0.4$, $p=0.01$) and a non-significant trend was observed with prospective 1-year growth ($r=0.2$, $p=0.14$). The correlation between NGAL levels and retrospective growth rate in the Spanish population persisted after adjustment for sex, age, dyslipidemia, current smoking, arterial hypertension, heart disease, creatinine and statin use (Table 1).

In order to further assess the potential prognostic value of NGAL we evaluated its plasma concentration in another group of 100 patients with AAAs from Australia (median initial AAA diameter 37.5, interquartile range 35.3–41.3 mm) followed for a median of 5.5 (interquartile range 2.5–6.0) years by a median of 7 (interquartile range 4–9) ultrasound scans. NGAL plasma concentration was weakly associated with averaged yearly AAA growth ($r=0.129$, $p=0.201$). Median weighted yearly AAA growths for patients with NGAL above and less than or equal to median concentration (≥ 53.30 ng/ml) were 1.7 (1.0–3.0) and 1.4 (0.8–2.1) mm/year, respectively, $p=0.202$. A close correlation between plasma NGAL and creatinine was observed in these patients ($r=0.409$, $p<0.0001$).

Table 1
Multivariate analysis in the Spanish group.

Model	Coefficients ^a		Standardized coefficients	t	Sig.
	Unstandardized coefficients	Std. error			
	B		Beta		
(Constant)	–1.094	5.982		–0.183	0.856
N-GAL	2.129E–5	0.000	0.456	2.421	0.022
Sex	–1.654	2.184	–0.124	–0.758	0.455
Age	0.058	0.070	0.152	0.836	0.410
Dyslipemia	–0.635	1.634	–0.105	–0.389	0.700
Smoking	1.407	0.963	0.232	1.460	0.155
HTA	1.481	1.024	0.237	1.446	0.159
Heart disease	–0.252	1.214	–0.039	–0.207	0.837
Creatinine	–2.385	2.207	–0.208	–1.081	0.289
Statin use	0.154	1.592	0.026	0.007	0.924

^a Dependent variable: retrospective growth.

4. Discussion

In the present study, we have shown that NGAL is released by circulating PMNs and by ILT of AAA patients. Furthermore, NGAL plasma concentrations were higher in subjects with AAA compared to age- and sex-matched healthy controls. Furthermore, we have observed that NGAL levels positively correlated with AAA retrospective growth.

PMNs activation can contribute to the main mechanisms of AAA evolution, namely ILT formation, oxidative stress, proteolytic degradation of the aortic media and adventitial inflammation. In this respect, previous studies support the importance of leukocyte activation in vascular diseases [11,20,21]. In CAD patients, systemic IL-8 and NGAL concentrations were significantly increased, indicating a primed state of circulating neutrophils in CAD [21]. In agreement, we have shown that NGAL and MPO and Cf-DNA levels are increased in PMN-conditioned media from AAA patients compared to healthy controls. Moreover, NGAL positively correlated with MPO and Cf-DNA in PMN-conditioned media, suggesting activation of circulating PMNs before entering the aneurysmal tissue. Interestingly, a previous report showed expression of NGAL in the luminal part of AAA [15]. In agreement, we have shown that NGAL levels were increased in conditioned media from explants of the luminal part of AAA-thrombus, probably reflecting the activation of PMNs entrapped within the ILT of human AAA. In this respect, we have previously shown increased levels of markers of neutrophil activation such as MPO and Cf-DNA both in AAA tissue-conditioned media and in plasma [22,23]. In the present paper, we have observed that circulating NGAL positively correlated with leukocyte count and MPO, further supporting the potential role of activated PMNs in the release of NGAL in AAA patients. Similarly, increased levels of PAP and DD were shown both in ILT conditioned media and plasma of AAA patients [24]. In the present paper, NGAL correlated with both, PAP and DD, suggesting that increased NGAL plasma levels observed in AAA patients could be a surrogate marker of the thrombus biological activity.

NGAL exists in monomeric and homo- and heterodimeric forms, the latter as a dimer with human neutrophil gelatinase, MMP-9 [10]. NGAL and gelatinase are in part physically separated, which may explain the existence of unassociated forms of both proteins in human neutrophils [25]. Although associated with neutrophil gelatinase, NGAL does not directly reflect the activity of gelatinase. In this respect, approximately 50% of the NGAL–gelatinase complex isolated from human neutrophils exists in a ternary complex with tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1). Gelatinase in this ternary complex has a 10-fold lower activity when activated than the forms of gelatinase not associated with TIMP-1 [26]. There was a previous report showing expression of NGAL associated to

MMP9 in the luminal part of AAA tissue [15]. Moreover, we have previously shown that NGAL/MMP9 complexes were increased in the conditioned media of ILT of human AAA and in plasma [22]. NGAL/MMP9 is not associated with AAA size or growth in the Spanish cohort (unpublished observations). Surprisingly, we did not find any association between NGAL and MMP9/NGAL complexes in plasma suggesting that NGAL could have an independent role to that of MMP9. In this respect, the rodent analogues of NGAL are not associated with gelatinase, indicating that this well conserved lipocalin may have other important functions [10]. Among these, NGAL possesses bacteriostatic properties by binding bacterial siderophores, thereby preventing bacteria from retrieving iron from this source [27]. Thus, our results could suggest that recruitment of PMNs in the iron-rich ILT release NGAL as a protective response to increased bacteria present in AAA tissue [23]. In any case, our observational study can not exclude the possibility that increased NGAL levels could also be, at least in part, the consequence of a response to increased MMP9 levels.

Although NGAL was identified in human neutrophils [9], NGAL may also be released by epithelial cells, renal tubular cells and hepatocytes during inflammation or injury [10,26]. Moreover, NGAL is a promising biomarker of acute kidney injury and increased NGAL levels correlate with decreased renal function [28]. Although impaired renal function has been linked to poor outcome after AAA repair, little is known about the role of chronic renal failure (CRF) as a potential risk factor in patients with AAA. In this respect, we have previously described that CRF was associated with higher AAA growth rates and more rapid expansion (>4 mm/year) in a large cohort of 3–3.9 cm AAA patients [29]. In the Spanish cohort, creatinine was not associated with AAA size or growth. NGAL positively correlated with creatinine in the Spanish and in the Australian cohort. However, correlation between NGAL and AAA activity in the Spanish cohort remained significant after analyzing the creatinine levels, suggesting that NGAL could have a role as a biomarker of AAA activity independently to its potential role as a biomarker of renal disease. However, further studies in larger patient cohorts are needed to confirm this issue.

On the whole, we have shown that NGAL is released by circulating PMNs and ILT of AAA patients. Furthermore, NGAL plasma levels are increased in AAA patients and correlate with AAA growth, probably reflecting a potential activation of both resident and circulating leukocytes. The biological consequences of increased NGAL levels are potentially linked to their functions as modulators of immune response [27]. However, further studies are needed to clarify the role of NGAL in AAA.

Acknowledgements

The paper have been supported by grants from the Basque Government (2008111019), cvREM091100, the European Community, FAD project (FP-7, HEALTH F2-2008-200647), the Spanish Ministerio de Ciencia y Tecnología (SAF 2010/21852), HF2007-0120, Ministerio de Sanidad y Consumo, Instituto de Salud Carlos III, Redes RECAVA (RD06/0014/0035) and EUS2008-03565. Research conducted by JG is supported by the NHMRC and Office of Health and Medical Research, Australia.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.atherosclerosis.2011.11.023.

References

- [1] Sakalihasan N, Limet R, Defawe OD. Abdominal aortic aneurysm. *Lancet* 2005;365:1577–89.
- [2] Swenberg J, Eriksson P. The intraluminal thrombus as a source of proteolytic activity. *Ann N Y Acad Sci* 2006;1085:133–8.
- [3] Michel JB, Martin-Ventura JL, Egido J, et al. Novel aspects of the pathogenesis of aneurysms of the abdominal aorta in humans. *Cardiovasc Res* 2011;90:18–27.
- [4] Thompson RW, Geraghty PJ, Lee JK. Abdominal aortic aneurysms: basic mechanisms and clinical implications. *Curr Probl Surg* 2002;39:110–230.
- [5] Michel JB, Thauan O, Houard X, Meilhac O, Caligiuri G, Nicoletti A. Topological determinants and consequences of adventitial responses to arterial wall injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007;27:1259–68.
- [6] Hannawa KK, Eliason JL, Woodrum DT, et al. L-selectin-mediated neutrophil recruitment in experimental rodent aneurysm formation. *Circulation* 2005;112:241–7.
- [7] Eliason JL, Hannawa KK, Ailawadi G, et al. Neutrophil depletion inhibits experimental abdominal aortic aneurysm formation. *Circulation* 2005;112:322–324.
- [8] Lindeman JH, Abdul-Hussien H, van Bockel JH, Wolterbeek R, Kleemann R. Clinical trial of doxycycline for matrix metalloproteinase-9 inhibition in patients with an abdominal aneurysm: doxycycline selectively depletes aortic wall neutrophils and cytotoxic T cells. *Circulation* 2009;119:2209–16.
- [9] Kjeldsen L, Johnsen AH, Sengeløv H, Borregaard N. Isolation and primary structure of NGAL, a novel protein associated with human neutrophil gelatinase. *J Biol Chem* 1993;268:10425–32.
- [10] Kjeldsen L, Cowland JB, Borregaard N. Human neutrophil gelatinase-associated lipocalin and homologous proteins in rat and mouse. *Biochim Biophys Acta* 2000;1482:272–83.
- [11] Elneihoum AM, Falke P, Hedblad B, Lindgarde F, Ohlsson K. Leukocyte activation in atherosclerosis: correlation with risk factors. *Atherosclerosis* 1997;131:79–84.
- [12] Zografos T, Haliassos A, Korovesis S, Giatzoglou E, Vouridis E, Katritsis D. Association of neutrophil gelatinase-associated lipocalin with the severity of coronary artery disease. *Am J Cardiol* 2009;104:917–20.
- [13] Yndestad A, Landrø L, Ueland T, et al. Increased systemic and myocardial expression of neutrophil gelatinase-associated lipocalin in clinical and experimental heart failure. *Eur Heart J* 2009;30:1229–36.
- [14] Giaginis C, Zira A, Katsargyris A, Klonaris C, Theocharis S. Clinical implication of plasma neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) concentrations in patients with advanced carotid atherosclerosis. *Clin Chem Lab Med* 2010;48:1035–41.
- [15] Folkesson M, Kazi M, Zhu C, et al. Presence of NGAL/MMP-9 complexes in human abdominal aortic aneurysms. *Thromb Haemostasis* 2007;98:427–33.
- [16] Caligiuri G, Rossignol P, Julia P, et al. Reduced immunoregulatory CD31+ T cells in patients with atherosclerotic abdominal aortic aneurysm. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006;26:618–23.
- [17] Norman PE, Flicker L, Almeida OP, Hankey GJ, Hyde Z, Jamrozik K. Cohort profile the health in men study (HIMS). *Int J Epidemiol* 2009;38:48–52.
- [18] Ferguson CD, Clancy P, Bourke B, et al. Association of statin prescription with small abdominal aortic aneurysm progression. *Am Heart J* 2010;159:307–13.
- [19] Martinez-Pinna R, Lindholt JS, Blanco-Colio LM, et al. Increased levels of thioredoxin in patients with abdominal aortic aneurysms (AAAs). A potential link of oxidative stress with AAA evolution. *Atherosclerosis* 2010;212:333–8.
- [20] Falke P, Elneihoum AM, Ohlsson K. Leukocyte activation: relation to cardiovascular mortality after cerebrovascular ischemia. *Cerebrovasc Dis* 2000;10:97–101.
- [21] Paulsson J, Dadfar E, Held C, Jacobson SH, Lundahl J. Activation of peripheral and in vivo transmigrated neutrophils in patients with stable coronary artery disease. *Atherosclerosis* 2007;192:328–34.
- [22] Houard X, Touat Z, Ollivier V, et al. Mediators of neutrophil recruitment in human abdominal aortic aneurysms. *Cardiovasc Res* 2009;82:532–41.
- [23] Delbosc S, Alsac JM, Journe C, et al. Porphyromonas gingivalis participates in pathogenesis of human abdominal aortic aneurysm by neutrophil activation. proof of concept in rats. *PLoS One* 2011;6:e18679.
- [24] Houard X, Rouzet F, Touat Z, et al. Topology of the fibrinolytic system within the mural thrombus of human abdominal aortic aneurysms. *J Pathol* 2007;212:20–8.
- [25] Kjeldsen L, Sengeløv H, Løllike K, Nielsen MH, Borregaard N. Isolation and characterization of gelatinase granules from human neutrophils. *Blood* 1994;83:1640–9.
- [26] Kolkenbrock H, Hecker-Kia A, Orgel D, Ulbrich N, Will H. Activation of progelatinase A and progelatinase A/TIMP-2 complex by membrane type 2-matrix metalloproteinase. *Biol Chem* 1997;378:71–6.
- [27] Flo TH, Smith KD, Sato S, et al. Lipocalin 2 mediates an innate immune response to bacterial infection by sequestering iron. *Nature* 2004;432:917–21.
- [28] Haase M, Bellomo R, Devarajan P, Schlattmann P, Haase-Fielitz A. NGAL Meta-Analysis Investigator Group. Accuracy of neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) in diagnosis and prognosis in acute kidney injury: a systematic review and meta-analysis. *Am J Kidney Dis* 2009;54:1012–24.
- [29] Vega de Céniga M, Gómez R, Estallo L, Rodríguez L, Baquer M, Barba A. Growth rate and associated factors in small abdominal aortic aneurysms. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2006;31:231–6.

8. Modelo de ratones knockout para NGAL:

Después de los resultados obtenidos en el artículo anterior, en el que planteamos que NGAL podría ser un marcador de activación en neutrófilos de pacientes con AAA, y como complemento a los resultados anteriores se realizó un modelo experimental con ratones *knockout* para NGAL (NGAL^{-/-}). El objetivo era analizar la implicación de NGAL en la formación y desarrollo del AAA. En este trabajo se provocó aneurisma de aorta abdominal en ratones *knockout* para la proteína NGAL mediante la inyección de elastasa.

8.1. Materiales y Métodos:

8.1.1. Inyección de elastasa en ratones *Knockout* para NGAL y en ratones WT:

Ratones de 12 semanas *knockout* para NGAL y en ratones *wild type* (WT, fenotipo salvaje) eran anestesiados con isoflurano inhalado al 4% y al 1.5-2% durante la laparotomía. Se les practicó una laparotomía horizontal y con la ayuda de un estereomicroscopio operativo se aisló la aorta abdominal; por debajo de las arterias renales y por encima de las arterias ilíacas anteriores. La aorta abdominal era aislada y ligada con hilo quirúrgico en la zona abdominal, por encima de las arterias ilíacas y por debajo de las renales (Figura 23). Se practicó un aortotomía con una aguja de calibre 30 (*World precision Instruments, Inc.*), y se introdujo un tubo de polietileno (PE-26), perfundiendo la aorta con solución salina o con elastasa porcina pancreática de tipo I (4.5 U/mL; E1250; Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri, USA). La aortotomía fue reparada, eliminando la ligación y visualizando la restauración del flujo sanguíneo. A los 14 días tras la cirugía los ratones eran sacrificados y el aneurisma era aislado e incluido en OCT para su posterior estudio. Se operaron 14 ratones NGAL^{-/-} con elastasa y 4 ratones NGAL^{-/-}. Se comparó el incremento del diámetro aórtico de los ratones NGAL^{-/-} a los que inyectaron elastasa, respecto a animales WT.

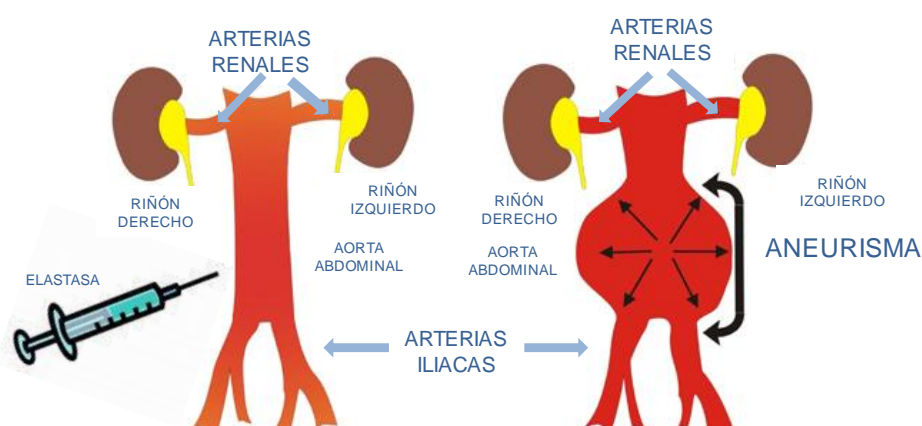


Figura 23: Aorta normal y aorta con aneurisma de aorta abdominal tras la inyección de elastasa.

8.1.2. Tinción Masson:

Se realizaron cortes de 5µm de la aorta para su posterior tinción masson siguiendo las instrucciones del kit (Bio Optica), es una técnica que permite visualizar claramente las fibras de colágeno el núcleo celular y el citoplasma. Se realizó la medición del ensanchamiento de la aorta y la comparación de los resultados entre las dos colonias de ratones.

8.2. Resultados:

Observamos una disminución del diámetro aórtico relativo en ratones NGAL^{-/-} tratados con elastasa en comparación con ratones WT tratados con elastasa [(0.59±0.083) vs (1.10±0.10) p= 0.002] (Figura 24).

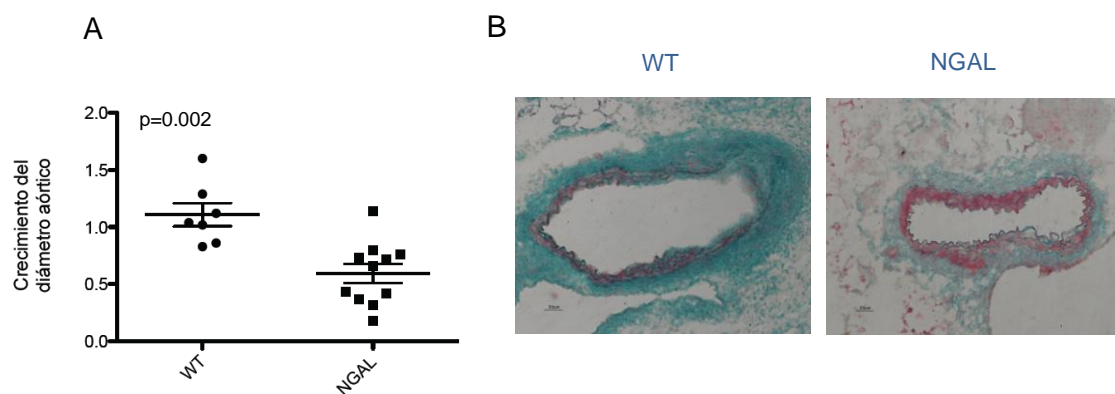
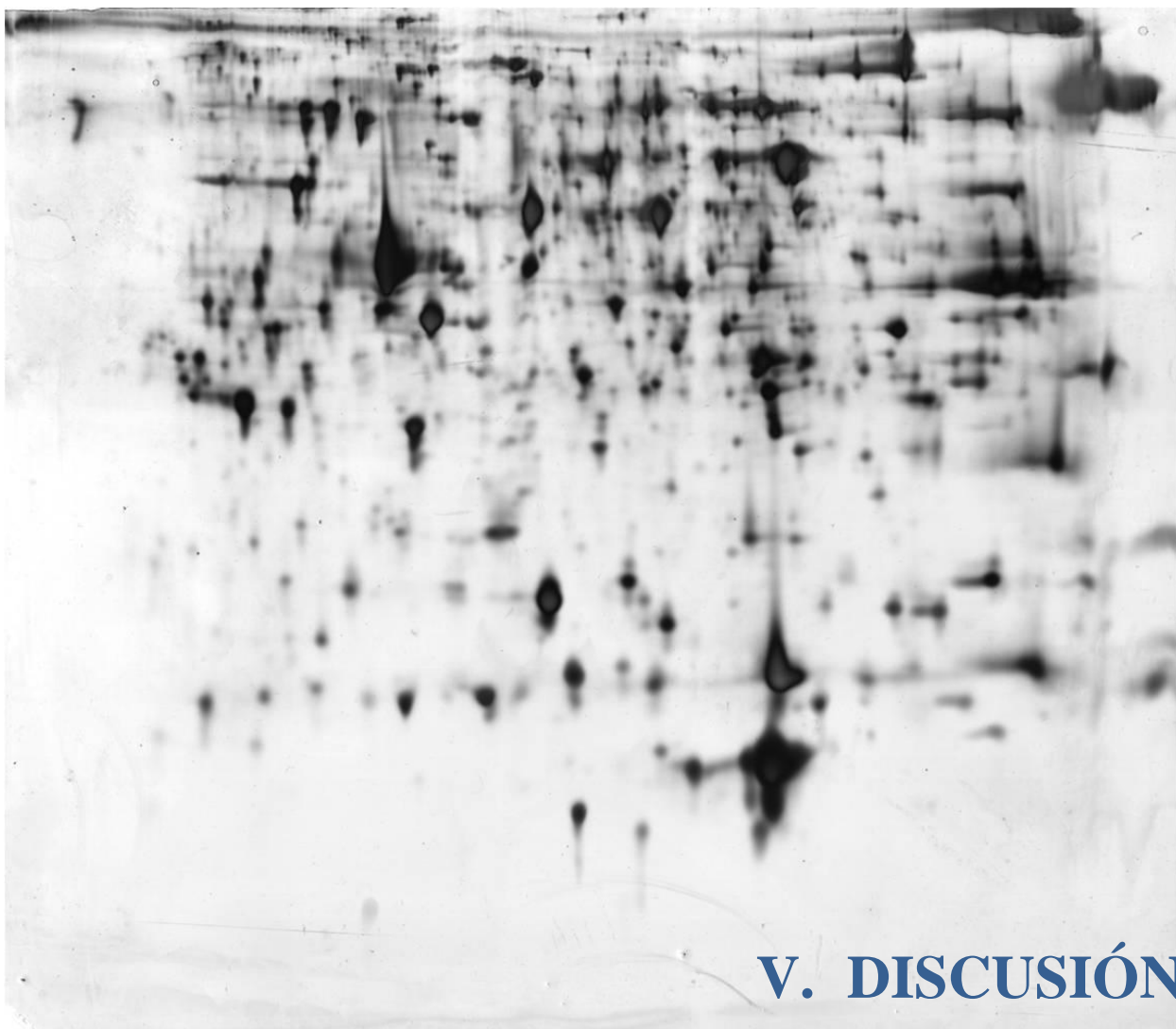


Figura 24: A) Representación gráfica del crecimiento del diámetro aórtico en ratones WT y NGAL^{-/-} tratados con elastasa. B) Cortes de 5µm de aneurismas de aorta abdominal de ratones WT y NGAL^{-/-}, teñidos con la tinción masson que nos permite medir el diámetro aórtico.

Por ello tras los resultados obtenidos en los que hemos visto una disminución del diámetro aórtico en ratones NGAL^{-/-} a los que se les ha provocado un AAA, nos hace pensar en un posible efecto deletéreo de esta proteína en el mecanismo de formación del AAA. Actualmente estamos analizando el infiltrado de neutrófilos y macrófagos, así como los niveles de MMP-9 para analizar si los efectos de la delección de NGAL se deben a su papel regulador de MMP-9.



V. DISCUSIÓN

1. Plasma

Debido a que la enfermedad aneurismática no presenta una sintomatología clara y su diagnóstico mayoritariamente es casual, el objetivo principal que nos planteamos en este trabajo es la búsqueda de posibles biomarcadores del AAA. Con el estudio de los biomarcadores de la enfermedad pretendemos no sólo un diagnóstico temprano de la enfermedad sino también una estratificación del riesgo para aplicar un mejor tratamiento evitando así, el peligro de crecimiento y por tanto la rotura del AAA (Nordon, I., 2009). Los biomarcadores tienen que ser moléculas implicadas en la patogénesis del AAA que sean de fácil cuantificación y que presenten alta sensibilidad y especificidad.

La muestra biológica más accesible es el plasma, por este motivo nos planteamos realizar un estudio proteómico con plasma de pacientes que presentan AAA de diferente diámetro y comparar los resultados obtenidos con un grupo control sano. El principal problema que plantea el plasma es su amplio rango dinámico y la presencia de proteínas mayoritarias que pueden enmascarar a otras de interés. Decidimos usar una columna de alta afinidad para quitar aquellas proteínas más abundantes en el plasma y posteriormente realizar el análisis proteómico mediante la técnica 2D-DIGE e identificación de las proteínas diferenciales por MALDI-TOF/TOF. Como resultado de esta técnica se identificaron 32 proteínas diferenciales entre los tres grupos de estudio (AAA; diámetro > 5cm, aaa; diámetro 3-5 cm y controles sanos). Entre las proteínas identificadas algunas ya se habían descrito anteriormente relacionadas al AAA como el fibrinógeno, la PCR, ceruloplasmina y la haptoglobina. Hemos dirigido nuestros experimentos hacia aquellas proteínas no asociadas previamente a la enfermedad aneurismática, como la RBP-4 (*Retinol Binding Protein*; proteína de unión al retinol) que observamos que aumenta diferencialmente en pacientes con AAA de pequeño diámetro (3-5cm). Estos resultados fueron posteriormente validados mediante un análisis por ELISA.

1.1. Función del RBP-4 en el AAA

La RBP-4 es una adipoquina de 24 kDa expresada mayoritariamente en el hígado cuya función es transportar la vitamina A o retinol a los tejidos. Se ha descrito que RBP-4 está asociada al síndrome metabólico (Van Dam, R.M., 2007), que es un conjunto de diversos factores de riesgo, como la hipertensión, obesidad, dislipemia y diabetes, y cuya presencia se ha asociado a una mayor probabilidad de padecer una enfermedad cardiovascular (Wassink, A.M., 2008). El síndrome metabólico también se ha asociado con una mayor probabilidad de sufrir un evento cardiovascular en pacientes con AAA (Ingelsson, E., 2009). En un artículo de Wild S. et al. se realizó un estudio con 1008 personas mayores de 70 años y se observó que existía una correlación positiva entre niveles de RBP-4, enfermedad cardiovascular y triglicéridos. También observaron que el aumento de tejido adiposo es un factor que contribuye al desarrollo de diabetes tipo 2 y enfermedad cardiovascular (Wild. S., 2000). Por otro lado, se ha visto que la diabetes en pacientes con AAA hace que el aneurisma progrese más lentamente (Vega de Céniga, M., 2006). Siendo la diabetes un factor protector en pacientes con AAA, hipotetizamos que la relación entre RBP-4, síndrome metabólico y AAA se

debe a dislipemia y/o resistencia a insulina asociada a obesidad. En relación a la dislipemia, los niveles bajos de HDL es uno de los mejores marcadores asociado a la presencia de AAA (Golledge, J., 2010) (Forsdahl, S.H., 2009). En este trabajo no hemos encontrado diferencias en los niveles de RBP-4 entre pacientes con o sin dislipemia o con los niveles de HDL. Por otro lado, en modelos animales se ha demostrado que la hiperglucemia protege de AAA y el tratamiento con insulina hace que el efecto protector disminuya (Miyama, N., 2010). También se ha visto que la delección de RBP-4 en ratones obesos provocaba mayor sensibilidad a la insulina (Broch, M., 2007) (Von Eynatten, M., 2008). RBP-4 se ha correlacionado positivamente con la expresión de GLUT4 en el tejido adiposo (Janke, J., 2006), siendo GLUT4 una proteína transmembrana que se encarga del transporte de glucosa al músculo y tejido adiposo (Yang, Q., 2005). Por todo este conjunto de resultados observados se ha descrito que RBP-4 podría ser un marcador de resistencia a insulina (Graham, T.E., 2006). En nuestro estudio observacional no podemos saber si el aumento de los niveles observados de RBP-4 en los pacientes con AAA son causa o efecto de los procesos metabólicos y del síndrome metabólico asociado a la enfermedad aneurismática, o a la participación de RBP-4 en la remodelación del AAA. En cambio, dado que RBP-4 favorece la resistencia a insulina podríamos hipotetizar que el aumento de RBP-4 en fases tempranas podría representar un mecanismo protector frente al desarrollo del AAA y que cuando disminuye (como ocurre en pacientes con AAA de diámetro grande) la enfermedad progresa. Así mismo, el aumento de RBP-4 en aneurismas pequeños puede reflejar una respuesta temprana a la enfermedad posiblemente asociada a procesos inmunoinflamatorios, ya que en estudios anteriores se ha visto que otras adipoquinas, como la adiponectina, están asociadas a la presencia de aneurismas de pequeño diámetro (Golledge, J., 2007). Con los resultados obtenidos en este estudio y lo observado en trabajos anteriores nos hace pensar en una posible implicación de RBP-4 en el desarrollo del AAA que tendrá que ser definido en estudios posteriores.

1.2. IGFBP-1 un nuevo biomarcador de AAA.

El análisis proteómico no proporcionó un gran número de proteínas desconocidas en la enfermedad aneurismática, probablemente debido al uso de la columna de afinidad para deplecionar proteínas mayoritarias presentes en el plasma. La depleción de las proteínas abundantes como la albúmina podría arrastrar mediante uniones inespecíficas otras proteínas involucradas en la patofisiología de la enfermedad como citoquinas (Granger, J., 2005). Por este motivo decidimos ampliar el estudio en plasma de pacientes con AAA analizando mediante un *array* de 20 citoquinas, siendo éstas importantes mediadores de la respuesta inmunoinflamatoria implicada en la patogénesis del AAA. La técnica de *arrays* de proteínas está basada en el análisis de un conjunto de proteínas que pueden estar implicadas en apoptosis, inflamación y/o rutas de señalización, mediante el uso de anticuerpos específicos. Algunas de las proteínas circulantes del plasma están en concentraciones muy altas o son indetectables por esta técnica, lo que supone una limitación de estos experimentos. Como resultado observamos unas series de citoquinas aumentadas en el plasma de

pacientes con AAA como son MIP-3 α (*Macrophage inflammatory protein 3 alpha*), eotaxina-2 e IGFBP-1 comparadas con un grupo de controles sanos. La sobreexpresión en pacientes de eotaxina puede estar asociada con diferentes mecanismos relacionados con la patogénesis del AAA como la inducción de metaloproteinasas, ya que eotaxina regula la expresión de pro-MMP-2 teniendo un papel crítico en el desarrollo de enfermedades aterotrombóticas (Kodali, R., 2006). De las citoquinas aumentadas en el plasma de pacientes nos hemos centrado en el estudio de IGFBP-1 debido a la diferencia de concentración tan elevada que hemos observado con el grupo control. El aumento de IGFBP-1 fue validado mediante ELISA en 30 pacientes y 30 controles sanos con similar edad, sexo y factores de riesgo, confirmando el aumento significativo de IGFBP-1 en el plasma de pacientes. También analizamos la posible asociación de IGFBP-1 con el tamaño del AAA, observando que existía una correlación positiva entre IGFBP-1 y el diámetro del aneurisma, siendo el diámetro del aneurisma un marcador de progresión del AAA. En estudios recientes han descrito una posible asociación de IGFBP-1 con el incremento del diámetro aneurismático (Yeap, Bu B., 2012), apoyando los resultados obtenidos en el estudio.

El síndrome metabólico se ha convertido en un factor predictivo de eventos cardiovasculares en pacientes con enfermedad aterosclerótica o aneurismática (Van Kuijk, JP., 2010). En este estudio no hemos encontrado relación entre las concentraciones de IGFBP-1 y los factores implicados en el síndrome metabólico. Los niveles elevados de IGFBP-1 en AAA podrían ir asociados al aumento de citoquinas que se han visto aumentadas en pacientes con AAA, como TNF e IFN (Golledge, J., 2007). Lang et al. han descrito que TNF incrementa los niveles de IGFBP-1 y esta respuesta va acompañada de un incremento en la expresión a nivel del mRNA de IGFBP-1 en hígado y riñón.

Quisimos ampliar el estudio analizando la posible implicación de IGFBP-1 en la formación y desarrollo del ILT, por ello consideramos la posible asociación del incremento de IGFBP-1 en plasma de pacientes con AAA y los marcadores de actividad trombótica como complejos plasmina-antiplasmina (PAP) y α -1-antitripsina (AAT), hallando una correlación positiva de IGFBP-1 con PAP y AAT. Previamente se había descrito que estos marcadores trombóticos están aumentados en el plasma de pacientes con AAA (Houard, X., 2007) (Houard, X., 2009). También se ha observado un aumento de IGFBP-1 en el tejido del AAA en comparación con aorta sana (Panek B, 2004). En nuestro estudio vemos un incremento de IGFBP-1 en el medio condicionado de las diferentes capas del ILT en comparación con el medio condicionado de la media aórtica sana, siendo posible que IGFBP-1 este presente en el trombo asociado a los PMNs que se encuentran atrapados en la capa luminal del ILT (Michel, J.B., 2011). Es posible que el aumento de IGFBP-1 en el medio condicionado esté asociado a la elevada concentración de IGFBP-1 del plasma de pacientes y a su posible retención tisular. También observamos la presencia de fragmentos proteolíticos de IGFBP-1 en el medio condicionado del trombo por western blot. Es importante destacar la presencia de numerosas enzimas proteolíticas liberadas en el trombo como la plasmina, elastasa y metaloproteinasas que pueden degradar IGFBP-1 (Gibson, T.L., 1999) (Mañes, S., 1997). La colocalización de IGFBP-1 y neutrófilos en el ILT hace

posible la hipótesis de la degradación del IGFBP-1 por enzimas proteolíticas posiblemente liberadas por neutrófilos.

También se sabe que IGFBP-1 se une a factores de crecimiento circulantes como IGF-1 y esta unión prolonga la vida media de los IGFs y altera su interacción con los receptores de la superficie celular. Por lo tanto, IGFBP-1 modula la función de IGF-1 (Wheatcroft, S.B., 2009) actuando como un inhibidor de su síntesis (Gustafsson, T., 1999). En artículos anteriores se había descrito que IGF-1 podría ser un marcador del AAA (Lindholt, JS., 2011). También se ha mostrado que IGF-1 puede modular la agregación plaquetaria y se ha observado la presencia del receptor de IGF-1 en los gránulos alfa de las plaquetas. Tras la activación plaquetaria, el receptor de IGF-1 es liberado localizándose en la membrana plasmática de las plaquetas (Motani, A.S., 1996) Por otro lado, la liberación al medio de IGF-1 provoca la activación de las plaquetas adyacentes (Karey, K.P., 1989), mediante la unión a su correspondiente receptor. En los experimentos realizados demostramos que IGFBP-1 protege de la agregación plaquetaria inducida por ADP y mediada por IGF-1, a diferentes concentraciones de IGFBP-1. Esta respuesta es similar a la observada en otros trabajos con IGFBP-2 e IGFBP-3, que inhiben la agregación inducida por IGF-1 (Marcinkiewicz, M., 2008). Tras estos resultados podemos sugerir que el ambiente proteolítico presente en el trombo podría favorecer la degradación de IGFBP-1 y la inhibición de la formación del complejo IGFBP-1/IGF-1 incrementa la unión de IGF-1 a su receptor presente en la membrana plaquetaria, lo que favorecería la agregación y la formación del trombo. La proteólisis de IGFBP-1 en el trombo puede ir asociada a una menor formación del complejo IGFBP-1/IGF-1, dando lugar una mayor agregación plaquetaria mediada por IGF-1 en el ILT.

El análisis del plasma mediante distintas aproximaciones (2-DIGE y arrays de proteínas) ha permitido la identificación de dos nuevos biomarcadores de AAA, RBP-4 e IGFBP-1. A nivel circulante, el aumento de RBP-4 e IGFBP-1 en el plasma de pacientes con AAA podría estar reflejando procesos inflamatorios y/o la presencia de síndrome metabólico en estos pacientes. A nivel tisular, la proteólisis de IGFBP-1 en el trombo de AAA podría favorecer la agregación plaquetaria mientras que se necesitan más estudios para explicar la función de RBP-4 en AAA (Figura 25).

2. Células circulantes

Continuando los objetivos que nos habíamos propuesto y debido a las dificultades encontradas en los estudios en plasma, nos planteamos un estudio más detallado de las células implicadas en la formación y desarrollo del ILT, como un factor importante en el desarrollo de la enfermedad. Como se había descrito que los PMNs, plaquetas y eritrocitos están presentes en el ILT (Kazi M, 2003), decidimos hacer un estudio de los subproteomas de estos tipos celulares y buscar posibles diferencias proteicas entre los tres grupos de estudio (AAA: diámetro > 5cm, aaa: diámetro 3-5 cm y controles sanos).

2.1. Implicación de las plaquetas en la formación y desarrollo del ILT

Las plaquetas, además de su conocida función en la trombosis y la hemostasis, contribuyen a la activación endotelial y modulan respuestas inflamatorias, con lo que favorecen el inicio y la formación de lesiones aterotrombóticas (Nchimi, A., 2010) (Dubick, M.A., 1999). El estudio del proteoma plaquetario nos parecía interesante por la implicación de las plaquetas en la formación del ILT. Además como habíamos visto anteriormente el posible efecto del IGFBP-1 en la agregación plaquetaria mediada por IGF-1, queríamos saber también si podría existir una alteración a nivel proteico en plaquetas circulantes de pacientes con AAA que pudiera relacionarse con la enfermedad aneurismática y la formación del ILT.

Hemos visto que los niveles de P-selectina, proteína liberada por las plaquetas tras su activación, estaban aumentados en plaquetas de pacientes respecto al grupo control. Se ha descrito que la P-selectina se encuentra en los gránulos alfa de las plaquetas, y tras la activación celular se transloca rápidamente hacia la superficie celular, donde se mantiene expuesta (Soong, C.V., 1993). De hecho, se considera que la P-selectina es un importante marcador de enfermedad vascular, dado que diversos estudios han demostrado que las plaquetas aumentan la expresión de esta proteína en su superficie a medida que evoluciona la formación de lesiones ateroscleróticas (Norman, P., 2004). El aumento de expresión de P-selectina en pacientes con AAA nos hace pensar que las plaquetas están más activadas en la enfermedad aneurismática y que son propensas a formar agregados, favoreciendo el estado protrombótico de estos pacientes.

En los resultados obtenidos del 2D-DIGE de plaquetas observamos que la mayoría de proteínas identificadas como diferenciales están implicadas en la formación de la matriz extracelular y del citoesqueleto. Las plaquetas son células anucleadas que se forman en la megacariocitopoyesis a nivel de la médula ósea, por fragmentación de la membrana plasmática de los megacariocitos, para posteriormente distribuirse por el torrente sanguíneo (Projahn, D., 2012). El citoesqueleto de la plaqueta consiste en una red de estructuras filamentosas que mantienen la forma discoide de la plaqueta en reposo (Patel, S.R., 2005). Así mismo, el citoesqueleto tiene el papel de dirigir y promover los cambios de forma inducidos por la activación plaquetaria (Fox, J.E., 2001). Los procesos de adhesión y activación plaquetaria cumplen un papel fisiológico esencial en la formación del coágulo, y constituyen un elemento fundamental durante eventos patológicos tromboembólicos (Tanaka, K., 1998).

Entre las proteínas diferenciales identificadas encontramos proteínas del citoesqueleto como la filamina A, que mantiene la citoarquitectura plaquetaria y es esencial para el movimiento y cambio de estructuras celulares que suceden durante la activación plaquetaria. En los últimos años, se ha encontrado una amplia variedad de proteínas que se unen a la filamina, incluyendo receptores transmembranales y moléculas de señalización (Stossel, T.P., 2001). De esta manera la filamina tendría un papel fundamental como estructuradora del citoesqueleto y como molécula mediadora de señales en respuesta a diversos estímulos. También hemos observado un aumento de proteínas como la gp96 o Grp94 y la ceruloplasmina en pacientes

con aneurisma grande. La Grp94 es una proteína de choque térmico encargada del plegamiento de proteínas intracelulares y está implicada en el crecimiento celular, diferenciación y supervivencia. En segundo lugar, la ceruloplasmina es un conocido marcador de fase aguda que aumenta en las enfermedades inflamatorias y en los síndromes coronarios agudos (Tang, W.H., 2011). También vimos un aumento en pacientes con aneurisma pequeño de proteínas como la GSTO-1, esta proteína pertenece a una familia de proteínas implicada en procesos importantes como los mecanismos de desintoxicación. La GSTO-1 puede estar aumentada en respuesta al incremento de estrés oxidativo observado en estos pacientes (Nebert, D.W., 2004).

Finalmente, encontramos que la Apo A1, proteína precursora de la HDL, esta aumentada en las plaquetas del grupo control con respecto a los pacientes. Hemos mostrado una correlación negativa entre las concentraciones de Apo A1 y el diámetro del AAA o el volumen del trombo. También observamos un aumento de Apo A1 en sobrenadantes de la capa luminal del trombo en comparación con la media sana. Estos resultados nos hacen pensar que la Apo A1 se encuentra retenida en el ILT, como hemos confirmado por inmunohistoquímica en el trombo de pacientes. La ApoA1 es una proteína clave en el transporte reverso del colesterol, proceso protector del desarrollo de aterosclerosis y AAA (Fielding, C.J., 1995). La Apo A1 puede tener un papel importante en la determinación de la especificidad de los receptores de HDL. En estudios anteriores, se detectó la unión de Apo A1 a las plaquetas por citometría de flujo, describiéndose una relación directa entre las lipoproteínas plasmáticas y la función hemostática de las plaquetas (Ozsavci, D., 2001). Se piensa que la interacción de las HDL con las plaquetas, a través de Apo A1, puede afectar a la composición y función plaquetaria. También se ha visto que las lipoproteínas del plasma pueden afectar a la activación plaquetaria (Andrews, H.E., 1987) (Shastri, K.M., 1980) (Aviram, M., 1995). Se ha descrito en pacientes con hipercolesterolemia que las lipoproteínas circulantes afectan al fenotipo de las plaquetas. En estos estudios han encontrado que lipoproteínas de baja densidad (LDL) y en algunos casos lipoproteínas de muy baja densidad podrían sensibilizar las plaquetas *in vitro* frente a varios agonistas si estas lipoproteínas eran añadidas al PRP o si estaban directamente en contacto las lipoproteínas con las plaquetas durante su aislamiento y posterior lavado. Estos mismos efectos eran observados cuando las LDL eran añadidas a sangre total y se determinaba la función plaquetaria mediante filtragometría (Broijersen, A., 1993). Por otro lado, se ha observado que el aislamiento de HDL tenía efectos opuestos a la LDL en la agregación plaquetaria y en algunos casos muestra un efecto inhibitor leve o antagoniza los efectos del LDL (Hassall, D.G., 1983). Se ha demostrado que la partícula de HDL inhibe la estimulación o el cambio conformacional de la plaqueta para la agregación plaquetaria (Aviram, M., 1983).

Estos resultados sugieren un aumento en la activación de las plaquetas circulantes de pacientes con AAA frente a un grupo control. Así mismo, la disminución de Apo A1 en plaquetas probablemente refleja la disminución observada en el plasma por un mecanismo posiblemente asociado a la degradación de Apo A1 en la lesión aneurismática, como se ha postulado en aterosclerosis (Lee-Rueckert, M., 2011).

2.2. Análisis proteómico de PMNs: catalasa un posible biomarcador de AAA

Los PMNs participan en el desarrollo de la formación y evolución del AAA y del ILT, en el estrés oxidativo, en la degradación proteolítica de la media y en la inflamación de la adventicia (Michel, J.B., 2011). Además representan la mayor clase de leucocitos circulantes, cuyo estudio ha sido de gran interés en aterotrombosis (Baetta, R., 2010) (Hannawa, K.K., 2005). Numerosos trabajos han mostrado la importancia de los PMNs en el estudio de aneurismas en modelos experimentales y en humanos (Fontaine, V., 2004) (Houard, X., 2009). Previamente se demostró que la depleción de PMNs inhibe la formación de aneurisma en modelos experimentales (Eliason, J.L., 2005). Se había observado que los neutrófilos atrapados en el ILT liberan MMP-9 al plasma agravando la enfermedad aneurismática (Houard, X., 2009). Recientemente, estudios de terapia preoperatoria con doxiciclina (un inhibidor de MMP-9) se observó que mejoraba el balance proteolítico en AAA humanos, descubriendo que la doxiciclina reduce selectivamente las proteasas derivadas de neutrófilos (Lindeman, J.H., 2009).

Hasta ahora muchas publicaciones se han centrado en el estudio individual de proteínas relacionadas con la función o actividad de los PMNs. Los estudios proteómicos ofrecen la posibilidad de un análisis global de todas las proteínas que podrían afectar a los PMNs en condiciones patológicas, y nos podrían dar información sobre los mecanismos implicados en la evolución del AAA. En este estudio hemos identificado proteínas que ya habían sido relacionadas con el AAA, como por ejemplo la lipocalina 2 y la ciclofilina en los PMNs de pacientes. La lipocalina 2 o NGAL es una proteína que previamente había sido localizada en la capa luminal del ILT asociada con MMP-9, aunque no se había analizado su papel como biomarcador circulante de AAA ni se habían realizado estudios funcionales (Folkesson, 2007). Por otro lado, la ciclofilina es una proteína que podría participar en diferentes mecanismos implicados en la remodelación vascular promoviendo la inflamación y proliferación de células del músculo liso (Satoh, K., 2008), aunque se desconocía su papel a nivel extracelular en AAA.

De las proteínas diferenciales identificadas en el estudio proteómico observamos un descenso intracelular de proteínas antioxidantes, como la catalasa y tioredoxina reductasa en PMNs circulantes de pacientes. En cambio los PMNs de pacientes presentan mayores niveles de H_2O_2 y liberan grandes cantidades de MPO al medio en comparación con los PMNs del grupo control. Además, hemos observado que hay un descenso no sólo de la expresión sino también de la actividad catalasa en PMNs de pacientes. Así mismo, también disminuyen la expresión de catalasa a nivel del ARNm (ácido ribonucleico mensajero), obteniendo resultados similares con la superóxido dismutasa de manganeso (MnSOD). En trabajos anteriores se ha visto una baja actividad de SOD en tejido de AAA (Dubick, M.A., 1999). También se ha descrito en modelos experimentales que la formación del AAA está asociada con un aumento temprano de la expresión de SOD (Sinha, I., 2007). Analizamos si los sistemas antioxidantes de PMNs podrían verse modificados bajo condiciones de incremento del estrés oxidativo en el medio, como ocurre en el ILT. Para ello incubamos los PMNs aislados con PMA (*Phorbol 12-myristate 13-acetate*), que induce la formación de ROS. La

incubación de PMNs de pacientes y controles con PMA nos muestran que hay un incremento de H_2O_2 y MPO en los PMNs de pacientes. También vimos en estos experimentos un descenso significativo de los niveles de ARNm de catalasa y MnSOD, lo cual podría sugerir un descenso global de enzimas antioxidantes en condiciones de estrés oxidativo en PMNs de pacientes.

Los glóbulos rojos están más expuestos al estrés oxidativo que otros tipos de células, debido a su contenido en hierro y oxígeno, que puede generar y aumentar los niveles de H_2O_2 y la peroxidación lipídica. Los hidroperóxidos no son muy reactivos, pero en presencia de hierro libre y moléculas donantes de electrones se convierten fácilmente a radicales hidroxilo, que causan daños sobre moléculas y tejidos (Lee, T.H., 2003). Al ser células altamente expuestas al estrés oxidativo por la elevada concentración de O_2 y Fe^{+2} presentan un sistema antioxidante muy potente. Así hemos observado niveles elevados de catalasa y Prdx-2 en la membrana de los eritrocitos del grupo control en relación a los pacientes. En ratones *knockout* para Prdx-2 que presentan anemia haemolítica (Lee, T.H., 2003), la deficiencia de Prdx-2 provoca la oxidación de cisteínas de proteínas de membrana en eritrocitos, lo que induce desnaturalización de moléculas intracelulares y por tanto la destrucción de glóbulos rojos. Prdx-2 puede proteger a los eritrocitos del estrés oxidativo intravascular debido a la presencia de esta proteína en la membrana (Lee, T.H., 2003). Esta proteína antioxidante está altamente expresada en eritrocitos y se cree que tienen un papel protector frente a ROS, siendo una defensa importante frente a los hidroperóxidos. Por lo tanto, estos resultados refuerzan la idea de que existe una alteración del balance redox en AAA, observándolo tanto a nivel de los PMNs circulantes como de los eritrocitos.

En los experimentos realizados en el plasma observamos un aumento de los niveles de MPO en el plasma de pacientes con AAA, siendo el MPO un biomarcador de estrés oxidativo en diferentes patologías cardiovasculares (Zhang, R., 2001) (Martin-Ventura, J.L., 2007) y demostrando que el MPO no sólo aumenta en aneurismas grandes sino también en aneurismas pequeños. Comprobamos mediante la técnica de ELISA que los niveles de catalasa en plasma eran significativamente menores en pacientes con AAA grandes frente a AAA pequeños y al grupo control. Dado que los AAA grandes y pequeños tienen similares factores de riesgo y medicación, la diferencia en los niveles de catalasa en plasma podría estar asociada con la progresión de la enfermedad aneurismática.

El análisis inmunohistoquímico muestra la presencia de catalasa en el ILT asociada a los PMNs. También observamos marcadas otras células no nucleadas que expresan catalasa y pueden ser los eritrocitos, así como una tinción extracelular difusa de catalasa en el ILT, lo que sugiere la liberación al medio extracelular de esta proteína. Finalmente, vemos un incremento de los niveles de catalasa en medio condicionado de ILT, así como previamente habíamos visto de Prdx-1/2 (Martinez-Pinna, R., 2011) lo que podría ser en respuesta al aumento de H_2O_2 que hemos observado en el ILT. Otros autores también han demostrado la presencia de catalasa en el medio extracelular, y ellos sugieren que la secreción de catalasa podría ser una respuesta a la demanda oxidativa inducida por neutrófilos a nivel local o para regular la

función de ROS (Sureda, A., 2007). El aumento de los niveles de catalasa y Prdx-1/2 en el ILT podría deberse a dos causas, a la lisis de PMNs y eritrocitos y la consecuente liberación del contenido intracelular, o la liberación en respuesta al aumento de productos oxidantes presentes en el ILT. Dentro de las moléculas pro-oxidantes en el trombo, la presencia de eritrocitos puede dar lugar a la hemólisis y por tanto la liberación de hemoglobina, el grupo hemo y hierro. Por otro lado, la molécula de H_2O_2 por si misma no es muy reactiva, el peligro del H_2O_2 es la rápida conversión a radicales hidroxilos por interacción con metales, de los que el hierro es quizás la molécula más importante *in vivo* (Suvorava, T., 2009).

Los sistemas antioxidantes son cruciales en los tejidos para desintoxicar de radicales libres y proteger contra los mecanismos del estrés oxidativo. En estudios previos se ha demostrado que la sobreexpresión de la catalasa inhibe la oxidación de LDL en tejido aórtico e impide la proliferación de células del músculo liso vascular (Guo, Z.M., 2001) (Shi, M.J., 2004). También la catalasa ha sido utilizada con éxito para reducir la peroxidación de lípidos en ratones (Nishikawa, M., 2009). El desequilibrio entre especies oxidantes y sistemas antioxidantes en pacientes con AAA, tanto a nivel sistémico como tisular indica la importancia del estrés oxidativo en la evolución del AAA. En estudios previos se demostró que la vitamina E atenúa la formación del AAA (Gavrila, D., 2005) ya que los animales que fueron tratados con vitamina E mostraban una reducción del 44% en la rotura de la aorta. La inhibición de ROS se ha demostrado que atenúa la formación del aneurisma (Xiong, W., 2009) y la presencia de ROS activa la adhesión de PMNs al aneurisma (Gasic, A.C., 1991). En estudios experimentales se ha visto que el tratamiento con tamoxifeno se asociaba con un incremento de la expresión de catalasa, acompañado con una disminución del infiltrado de PMNs y disminución de la formación del AAA (Grigoryants, V., 2005). Recientemente se ha demostrado que la sobreexpresión de catalasa en células del músculo liso previene los cambios patológicos que inducen la formación del AAA (Maiellaro-Rafferty, K., 2011). Estos estudios y los resultados obtenidos en esta tesis sugieren una posible terapia en pacientes con AAA basada tanto en la reducción de factores pro-oxidantes (por ejemplo MPO, H_2O_2) como en el desarrollo de metodologías para aumentar la producción y actividad de enzimas antioxidantes (por ejemplo catalasa y Prdx).

2.3. Función de la CypA en el AAA

La ciclofilina A (CypA) es una de las proteínas diferenciales que encontramos aumentada en PMNs de pacientes con AAA. La CypA es una proteína citosólica de 18 kDa que ha sido estudiada como proteína multifuncional implicada en diferentes enfermedades inflamatorias como artritis reumatoide, enfermedades autoinmunes y cáncer. CypA ha sido clasificada como una inmunofilina que tiene una variedad de funciones intracelulares incluyendo señalización intracelular, movilización de proteínas y regulación de la actividad de otras proteínas (Satoh, K., 2010). Además de sus funciones intracelulares, CypA es secretada al medio extracelular y tiene un papel fisiológico y patológico en las enfermedades cardiovasculares, por lo que es un potencial biomarcador y mediador en la estenosis vascular, la aterosclerosis y el aneurisma aórtico abdominal (Nigro, P., 2011). Recientes investigaciones han descubierto nuevas propiedades y funciones de

las ciclofilinas incluyendo actividad peptidil prolil isomerasa, de reparación, mantenimiento de la función mitocondrial, implicación en apoptosis, regulación de la función de células T e inflamación. Se ha descrito un efecto protector de la CypA en mioblastos, cardiomiocitos y en modelos celulares para la enfermedad de Alzheimer (Ge, Y.S., 2009) (Doyle, V., 1999) (Hong, F., 2002), así como en la desensibilización de las células cancerígenas (Choi, K. J., 2007). Un mayor conocimiento de la función de las ciclofilinas podría ser importante para determinar aplicaciones clínicas para el tratamiento y diagnóstico de todas estas enfermedades (Yao, Q., 2005).

Mientras que la mayoría de los estudios publicados analizan el papel de la CypA en las enfermedades cardiovasculares basándose en líneas celulares y/o modelos animales, hay pocos datos en cuanto a su papel potencial como biomarcador en patología humana. Nuestro objetivo era analizar si CypA podría ser un marcador de progresión de AAA. En los resultados obtenidos primero observamos que las concentraciones de CypA disminuyen en plasma de pacientes con aneurisma grande comparado con los aneurismas pequeños. Los niveles de CypA en el plasma pacientes con AAA es diferente a la de otras proteínas implicadas en el estrés oxidativo como tioredoxina (TRX) o Prdx, que aparecen incrementadas en pacientes con enfermedad aneurismática (Martinez-Pinna R, 2010) (Martinez-Pinna R, 2011). Es importante recordar que TRX y Prdx son expresadas por leucocitos y eritrocitos que están presentes en la capa luminal del ILT, mientras que la CypA es expresada mayoritariamente en CMLV. Dado que la evolución del AAA se caracteriza por remodelación de la pared vascular, principalmente debido a la proteólisis y posterior formación del trombo, nos planteamos que la primera respuesta al estrés oxidativo pudiera ser mediada por las CMLV mediante la secreción de CypA y en segundo lugar por una liberación de TRX y Prdx por PMNs y eritrocitos, células presentes en el ILT. Analizamos los niveles de CypA en el medio condicionado de muestras de ILT, media patológica y media sana. CypA está aumentada en el sobrenadante de la media sana en comparación con la media patológica y el trombo. Realizamos un análisis por inmunohistoquímica para conocer la localización de CypA en el ILT y observamos que se expresa en la capa luminal del trombo asociada a la presencia de PMNs. Encontramos otros estudios que muestran un incremento de la expresión de CypA en la pared patológica (Sato, K., 2009). En cambio no hay estudios que comparen la secreción de CypA entre aorta sana y patológica. Dado que las principales productoras de CypA son las CMLV, las diferencias observadas en el medio condicionado de media patológica y media sana se pueden deber al número de CMLV, siendo la pérdida de CMLV una de las principales características de la enfermedad aneurismática (Henderson, E. L., 1999) (López-Candales, A., 1997). Ya que durante la expansión del AAA existe una disminución de las CMLV, (Rowe, V. L., 2000) esto podría estar asociado con una disminución de la capacidad de secretar CypA en las últimas etapas de evolución de la AAA. El descenso de CypA que observamos en el plasma de AAA puede deberse a la disminución de las CMLV, sin embargo, no hemos podido determinar si otras fuentes de secreción de CypA (por ejemplo células circulantes) o la degradación por proteasas, también podrían contribuir a la alteración de los niveles plasmáticos de CypA. Posteriores estudios en un mayor

número de pacientes podrán confirmar el valor potencial de CypA como un biomarcador circulante de la progresión del AAA.

El papel extracelular de CypA en la modulación de ROS se ha estudiado en muchas patologías y tipos celulares. En los experimentos realizados observamos que en CMLV humanas la proteína recombinante de CypA (rhCypA) puede reducir la producción de ROS inducida por H_2O_2 . La CypA puede actuar como un captador de ROS o como un inductor de la respuesta antioxidante como se ha descrito previamente en estudios *in vitro* de células T humanas o CMLV (Gourlay, L. J., 2007). La respuesta anti-oxidante que mostramos es dependiente de la presencia de un estímulo pro-oxidante. Los diferentes resultados obtenidos en comparación con trabajos anteriores pueden deberse a la pureza de la CypA recombinante utilizada en estos estudios, ya que se ha demostrado que la contaminación por endotoxinas puede cambiar los efectos mediados por CypA (Payeli, S. K., 2008), como la inducción de ROS mediante LPS (lipopolisacáridos) en las CMLV (Heo, S.K., 2010). En nuestro trabajo se usó rhCypA según las dosis recomendadas anteriormente (Payeli, S. K., 2008). Aunque no se ha medido la concentración CypA en el tejido y cómo afecta a otros tipos de células, tales como células endoteliales, sí hemos demostrado que la concentración de CypA en el plasma de AAA es seis veces menor que la necesaria para producir daño endotelial.

En conclusión, nosotros mostramos descenso de los niveles circulantes de CypA en el plasma de pacientes con aneurisma grande acompañado de una disminución de CypA extracelular en el vaso patológico sugiriendo que la reducción de CypA se asocia con una progresión del AAA. Finalmente vemos un efecto protector antioxidante de CypA extracelular en CMLV *in vitro*, aunque el estudio de la función de CypA y sus posibles aplicaciones en la terapia del AAA requieren más experimentos en el futuro. Futuras investigaciones deberían centrarse en la actividad biológica mediada por la CypA, incluyendo regulación génica, interacción proteína-proteína y señales de transducción. También sería importante el estudio de su posible aplicación clínica en el diagnóstico y tratamiento de enfermedades vasculares.

2.4. NGAL marcador de activación de neutrófilos en pacientes con AAA

Como hemos descrito en el estudio proteómico de PMNs, la expresión de NGAL en PMNs de pacientes con AAA es superior en los PMNs de controles. NGAL es una molécula del sistema inmune innato (Boekhorst, B.C., 2011) que se ha descrito asociada a la presencia de enfermedades cardiovasculares (Elneihoum, A.M., 1997). Se ha visto que en pacientes con enfermedad arterial coronaria las concentraciones de NGAL están incrementadas, hipotetizando que el aumento de NGAL podría indicar una mayor activación de los neutrófilos en estos pacientes (Paulsson, J., 2007). En este trabajo mostramos que NGAL es liberada por PMNs y por el ILT de pacientes con AAA, siendo las concentraciones de NGAL en plasma de pacientes más elevadas en comparación al grupo control. Además observamos una correlación positiva entre los niveles de esta proteína y el crecimiento retrospectivo del aneurisma. También mostramos un aumento de NGAL en el medio condicionado de PMNs circulantes de pacientes, así como de los niveles de MPO y Cf-

DNA (Cell-free DNA, ADN liberado) existiendo una correlación positiva entre NGAL y las concentraciones de MPO y Cf-DNA, lo que corrobora la activación de los PMNs circulantes de pacientes con AAA. Previamente se había descrito el aumento de MPO y Cf-DNA en los sobrenadantes de tejido patológico y en el plasma de pacientes con AAA (Houard, X., 2009) (Delbosc, S., 2011), así como la presencia de NGAL en la capa luminal del trombo (Folkesson, M., 2007). En este trabajo mostramos un aumento de NGAL en el medio condicionado de la capa luminal del ILT, corroborando la activación de los PMNs presentes en el trombo. En otros estudios se había observado un aumento de marcadores protrombóticos como PAP y los D-dímeros (DD) en el plasma de pacientes con AAA (Houard, X., 2007). Hemos comprobado que existe una correlación positiva entre los niveles de NGAL plasmáticos con los marcadores de actividad trombótica PAP y DD, por tanto, confirmamos no sólo que hay una activación de los PMNs en pacientes, sino que este posiblemente asociado a un aumento de la actividad trombótica.

Existen dos formas de NGAL, la monomérica y la heteromérica, ésta última con unión a la gelatinasa o MMP-9 (Kjeldsen, L., 2000). NGAL y gelatinasa están separadas físicamente por lo que no es raro encontrar las dos formas de NGAL en neutrófilos humanos (Kjeldsen, L., 1994). Una de las funciones de NGAL es la prolongación de la actividad de MMP-9 tras la formación de un complejo resistente a la degradación, NGAL/MMP-9 (Boekhorst, B.C., 2011). En estudios anteriores se muestran que la expresión de NGAL asociada a MMP-9 en la capa luminal del ILT (Folkesson, M., 2007). También se ha demostrado que el complejo NGAL/MMP-9 está incrementado en el medio condicionado del ILT en comparación con la capa aórtica media sana, así como en el plasma de los pacientes con AAA (Houard X, 2009). Y aunque NGAL este asociada a la gelatinasa no por ello refleja directamente la actividad de esta enzima. Nosotros no encontramos ninguna asociación entre NGAL y el complejo NGAL/MMP-9 en plasma lo que sugiere que NGAL puede tener un efecto independiente de MMP-9. En cualquier caso, nuestro estudio observacional no puede excluir la posibilidad de que el aumento de los niveles de NGAL también podría ser consecuencia de una respuesta al aumento de los niveles de MMP-9 en los pacientes con AAA. A pesar de que NGAL fue identificada en los neutrófilos humanos (Kjeldsen L, 1993), también puede ser liberada por células epiteliales, células tubulares renales y los hepatocitos durante la inflamación (Kjeldsen, L., 2000) (Kolkenbrock, H., 1997). NGAL es un posible biomarcador de lesión renal aguda ya que el aumento de los niveles de NGAL se correlacionan con un descenso de la función renal (Haase, M., 2009). Se sabe poco sobre el papel de la insuficiencia renal crónica (IRC) como factor de riesgo en pacientes con AAA, pero se ha descrito previamente que la IRC se asocia con mayor crecimiento del AAA y mayor rapidez en su expansión (Vega de Céniga, M., 2006). En nuestro grupo de pacientes no hemos visto asociación entre los niveles de creatinina con el tamaño o crecimiento del AAA, pero si observamos una correlación positiva entre los niveles de NGAL y la creatinina, así como una correlación entre NGAL y el diámetro del AAA.

En un modelo de experimentación animal con ratones *knockout* para NGAL a los que se les ha provocado aneurisma mediante la inyección de elastasa en la aorta abdominal, observamos que el diámetro

relativo de la aorta a los 14 días tras la cirugía es menor en ratones NGAL^{-/-} en comparación con el fenotipo salvaje. Por tanto podemos pensar en una posible función deletérea de NGAL en la patología del AAA. NGAL se une a MMP-9 modulando su actividad (Boekhorst, B.C., 2011), lo que nos hace pensar que la falta de NGAL haga que la función de MMP-9 pueda verse reducida y por tanto la degradación de la matriz y la lesión aneurismática. En cualquier caso, dado que NGAL posee otras funciones independientes de MMP-9, no podemos excluir que otros mecanismos asociados a sus diversas funciones puedan estar participando en el efecto observado. Además tras los resultados obtenidos proponemos que NGAL podría tener un papel como un biomarcador de la actividad del AAA independientemente tanto de su papel como biomarcador de la enfermedad renal. Las consecuencias biológicas del incremento de los niveles de NGAL pueden estar relacionadas directamente con su función como modulador de la respuesta inmune en la enfermedad aneurismática.

En el estudio realizado en células circulantes de pacientes hemos descrito posibles biomarcadores de la enfermedad aneurismática abarcando diferentes mecanismos implicados en la formación y desarrollo de la lesión. La disminución de Apo A1 en plaquetas puede reflejar la disminución observada en el plasma por un mecanismo posiblemente asociado a la degradación de Apo A1 en la lesión aneurismática. En PMNs hemos estudiado el balance redox y encontramos proteínas como la catalasa y la CypA, cuya modulación se asocia a la progresión de la enfermedad aneurismática. También describimos como posible biomarcador de la enfermedad aneurismática a NGAL, proteína relacionada con la respuesta inmunoinflamatoria, ya que los niveles de NGAL en plasma podrían reflejar la activación de neutrófilos. En conjunto, estos resultados pueden sugerir nuevas terapias para prevenir la evolución de AAA basadas en la inhibición de procesos redox e inmunoinflamatorios (Figura 25).

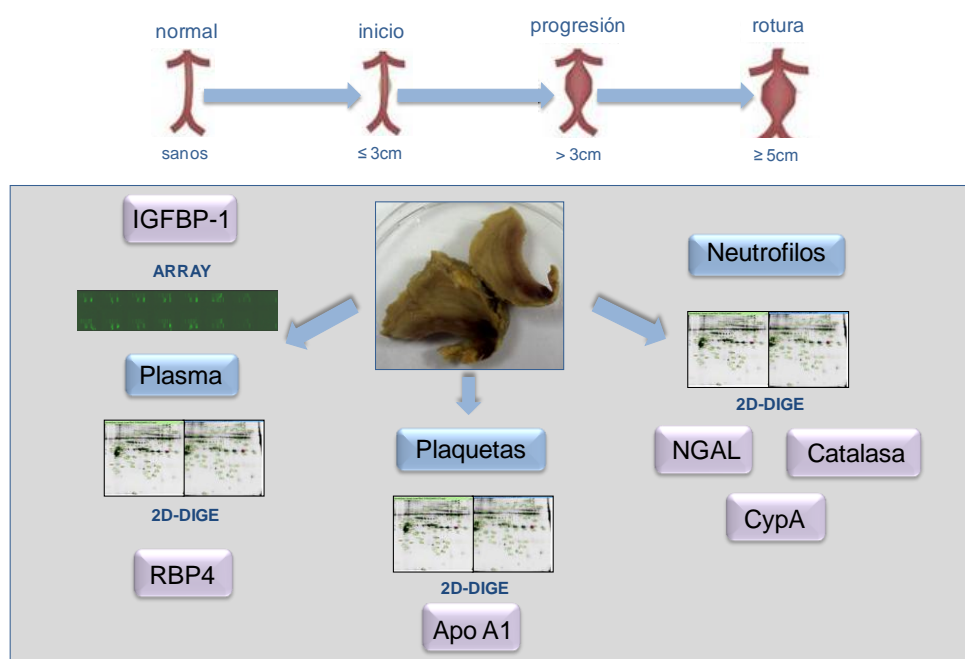
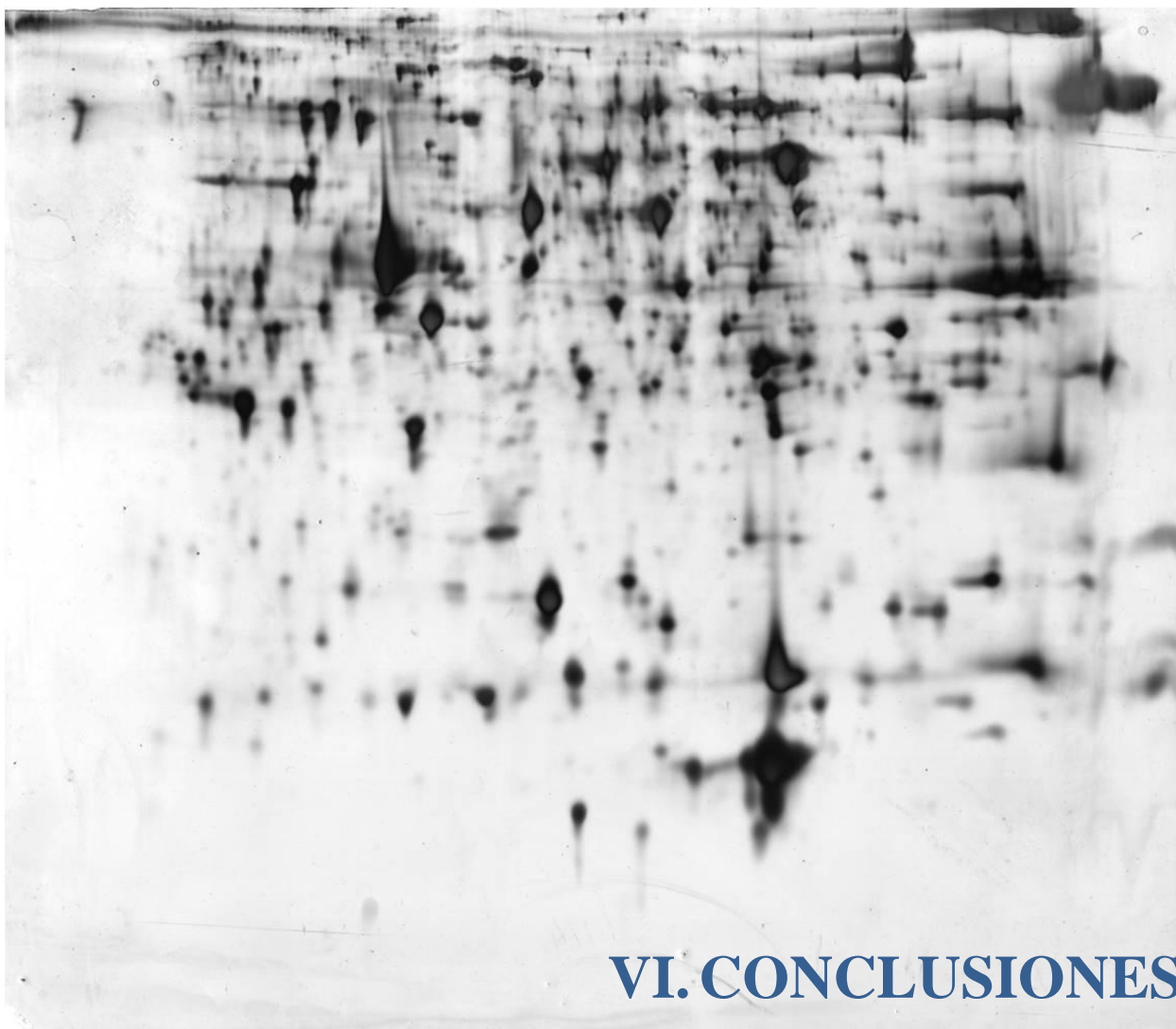


Figura 25: Resumen del plan de trabajo desarrollado para abordar los objetivos propuestos al inicio de esta tesis.



Conclusiones

- 1.- La aplicación de la técnica 2D-DIGE en plasma deplecionado de proteínas mayoritarias nos ha permitido la identificación de proteínas diferenciales en pacientes con AAA, entre ellas el RBP-4. El aumento de RBP-4 en pacientes con AAA pequeño puede representar una respuesta de fase aguda o estar asociada con el síndrome metabólico y/o la resistencia a insulina.
- 2.- El análisis de plasma mediante *arrays* de citoquinas nos muestra un incremento de los niveles de IGFBP-1 en pacientes con AAA, posiblemente asociado a una respuesta inflamatoria crónica. La retención y proteólisis de IGFBP-1 en el trombo podría favorecer la agregación plaquetaria mediada por IGF-1.
- 3.- En plaquetas de pacientes con AAA observamos niveles elevados de P-selectina, lo que indica una mayor activación plaquetaria que podría favorecer el estado protrombótico de estos pacientes. El análisis 2D-DIGE de plaquetas de pacientes demuestra un descenso de la Apo A1, asociada a la disminución de ApoA1 en plasma y posiblemente a su degradación vascular.
- 4.- El análisis por 2D-DIGE de PMNs circulantes de pacientes con AAA ha identificado varios posibles marcadores como la catalasa, la CypA y el NGAL. El descenso de la expresión de catalasa en PMNs y en la membrana de eritrocitos de pacientes sugiere la importancia del estrés oxidativo en la evolución del AAA.
- 5.- El descenso de los niveles circulantes de CypA en pacientes con AAA grande podría indicar un descenso de la liberación de CypA por la pared patológica asociada con la progresión de la enfermedad. La función de CypA extracelular en CMLV parece indicar un papel antioxidante protector en AAA.
- 6.- El aumento de los niveles de NGAL en plasma de AAA podría reflejar la activación de neutrófilos a nivel sistémico. La función deletérea de NGAL en la formación del AAA experimental puede estar asociada a su papel en la modulación de la actividad de MMP-9.

Conclusión definitiva

1- *La proteómica es una herramienta útil para la búsqueda de potenciales biomarcadores de la enfermedad aneurismática. La aplicación de técnicas proteómicas ha sido fundamental para la identificación de proteínas diferenciales en el plasma, aunque debido al rango dinámico de este tipo de muestra se complementó el estudio con el uso de columnas cromatográficas y arrays de proteínas. A pesar de las dificultades encontradas hemos descrito dos posibles biomarcadores, RBP-4 e IGFBP-1. Otros tipos de aproximaciones proteómicas usando técnicas sin marcaje, espectrómetros de masas más potentes como el orbitrap, así como herramientas de análisis de datos avanzados podrán aportar más información sobre la enfermedad en el futuro.*

2- *Dentro del estudio de los subproteomas celulares describimos otros posibles biomarcadores de la enfermedad aneurismática, la catalasa y CypA implicadas en el balance redox, y NGAL implicada en los procesos inmunoinflamatorios y proteolíticos claves en el avance de la patología. Estos nuevos biomarcadores podrían ayudar tanto en el diagnóstico y pronóstico de la enfermedad, como en la aplicación de nuevas terapias. Estos estudios ponen de manifiesto la importancia de la actividad biológica de las células que componen el trombo, cuyo papel es clave en la formación y progresión de la enfermedad aneurismática.*



VII. BIBLIOGRAFÍA

Bibliografía

1. -Adolph R, Vorp DA, Steed DL, Webster MW, Kamenewa MV, Watkins SC. Cellular content and permeability of intraluminal thrombus in abdominal aortic aneurysm. *J Vasc Surg*. 1997; 25:916–926.
2. -Al-Barjas HS, Ariens R, Grant P, Scott JA. Raised plasma fibrinogen concentration in patients with abdominal aortic aneurysm. *Angiology*. 2006; 57:607– 614.
3. -Alvarez-Llamas G, De la Cuesta F, Barderas MG, Darde VM, Zubiri I, Caramelo C, Vivanco F. A novel methodology for the analysis of membrane and cytosolic sub-proteomes of erythrocytes by 2-DE. *Electrophoresis*. 2009; 30(23):4095-108.
4. -Anderson NL, Anderson NG. The human plasma proteome: history, character, and diagnostic prospects. *Mol Cell Proteomics*. 2002; 1:845-67.
5. -Andrews HE, Aitken JW, Hassall DG, Skinner VO, Bruckdorfer KR. Intracellular mechanism in the activation of human platelets by low-density lipoproteins. *Biochem J*. 1987; 242:559–64.
6. -Arbonés ML, Ord DC, Ley K, Ratech H, Maynard-Curry C, Otten G, Capon DJ, Tedder TF. Lymphocyte homing and leukocyte rolling and migration are impaired in L-selectin-deficient mice. *Immunity*. 1994; 1(4):247-60.
7. -Archakov AI, Ivanov YD, Lisitsa AV, Zgoda VG. AFM fishing nanotechnology is the way to reverse the Avogadro number in proteomics. *Proteomics*. 2007; 7:4-9.
8. -Atturu G, Brouillette S, Samani NJ, London NJ, Sayers RD, et al. Short leukocyte telomere length is associated with Abdominal Aortic Aneurysm (AAA). *Eur J Vasc Endovasc*. 2010; Surg 39: 559–564.
9. -Aviram M, Brook JG. Characterizations of the effect of plasma lipoproteins on platelet function in vitro. *Haemostasis*. 1983; 13:344–50.
10. -Aviram M. LDL–platelet interaction under oxidative stress induces macrophage foam cell formation. *Thromb Haemostasis*. 1995; 74:560–4.
11. -Baetta R, Corsini A. Role of polymorphonuclear neutrophils in atherosclerosis: current state and future perspectives. *Atherosclerosis*. 2010; 210:1–13.
12. -Balla J, Vercellotti GM, Jeney V, Yachie A, Varga Z, Jacob HS, Eaton JW, Balla G. Heme, Heme Oxygenase, and Ferritin: How the Vascular Endothelium Survives (and Dies) in an Iron-Rich Environment. *Antioxid Redox Signal*. 2007; 9(12):2119-37.
13. -Becker RC, Oney S, Becker KC, Rusconi CP, Sullenger B. Nucleic acid aptamers and their complimentary antidotes. Entering an era of antithrombotic pharmacobiologic therapy. *Hamostaseologie*. 2007; 27, (5) 378-382.

14. -Bjellqvist B, Ek K, Righetti PG, Gianazza E, Görg A, Westermeier R, Postel W. Isoelectric focusing in immobilized pH gradients: principle, methodology and some applications. *J Biochem Biophys Methods*. 1982; 6:317-39.
15. -Bjorhall K, Miliotis T, Davidsson P. Comparison of different depletion strategies for improved resolution in proteomic analysis of human serum samples. *Proteomics*. 2005; 5:307-17.
16. -Blackstock WP, Weir MP. Proteomics: quantitative and physical mapping of cellular proteins. *Trends Biotechnol*. 1999; 17:121-7.
17. -Boekhorst BC, Bovens SM, Hellings WE, van der Kraak PH, van de Kolk KW, Vink A, Moll FL, van Oosterhout MF, de Vries JP, Doevendans PA, Goumans MJ, de Kleijn DP, van Echteld CJ, Pasterkamp G, Sluijter JP. Molecular MRI of murine atherosclerotic plaque targeting NGAL: a protein associated with unstable human plaque characteristics. *Cardiovasc Res*. 2011; 89(3):680-8.
18. -Bonnefoy A, Legrand C. Proteolysis of subendothelial adhesive glycoproteins (fibronectin, thrombospondin, and von Willebrand factor) by plasmin, leukocyte cathepsin G, and elastase. *Thromb Res*. 2000; 98:323–332.
19. -Broch M, Vedrell J, Ricart W, Richart C, Fernández-Real JM. Circulating retinolbinding protein-4, insulin sensitivity, insulin secretion, and insulin disposition index in obese and non obese subjects. *Diabetes Care*. 2007; 30:1802–6.
20. -Broijersén A, Wallén NH, Vitols S, Larsson PT, Hjemdahl P. Autologous low-density lipoprotein enhances platelet aggregation in whole blood, as measured by in vitro filteragometry. *Platelets*. 1993; 4:11–5
21. -Bullard DC, Kunkel EJ, Kubo H, Hicks MJ, Lorenzo I, Doyle NA, Doerschuk CM, Ley K, Beaudet AL. Infectious susceptibility and severe deficiency of leukocyte rolling and recruitment in E-selectin and P-selectin double mutant mice. *J Exp Med*. 1996; 183: 2329–2336.
22. -Bullard DC, Qin L, Lorenzo I, Quinlin WM, Doyle NA, Bosse R, Vestweber D, Doerschuk CM, Beaudet AL. P-selectin/ICAM-1 double mutant mice: acute emigration of neutrophils into the peritoneum is completely absent but is normal into pulmonary alveoli. *J Clin Invest*. 1995; 95(4):1782-8.
23. -Choi KJ, Piao YJ, Lim MJ, Kim JH, Ha J, Choe W, Kim SS. Overexpressed cyclophilin A in cancer cells renders resistance to hypoxia- and cisplatin-induced cell death., *Cancer Res*. 2007; 67, 3654–3662.
24. -Cornuz J, Sidoti Pinto C, Tevaearai H, Egger M. Risk factors for asymptomatic abdominal aortic aneurysm: systematic review and meta-analysis of population-based screening studies. *Eur J Public Health*. 2004; 14(4):343-9.

25. -Cotter RJ. Time-of-flight mass spectrometry for the structural analysis of biological molecules. *Anal Chem* 1992; 64:1027A-39A.
26. -Delbosc S, Alsac JM, Journe C, Louedec L, Castier Y, Bonnaure-Mallet M, Ruimy R, Rossignol P, Bouchard P, Michel JB, Meilhac O. Porphyromonas gingivalis participates in pathogenesis of human abdominal aortic aneurysm by neutrophil activation. Proof of concept in rats. *PLoS One*. 2011;6:e18679.
27. -Doyle V, Virji S and Crompton M. Evidence that cyclophilin-A protects cells against oxidative stress. *Biochem. J.* 1999; 341 (Pt 1), 127–132.
28. -Dubick MA, Keen CL, DiSilvestro RA, Eskelson CD, Ireton J, Hunter GC. Antioxidant enzyme activity in human abdominal aortic aneurismal and occlusive disease. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1999; 220:39–45. 25.
29. -Eletto D, Dersh D, Argon Y. GRP94 in ER quality control and stress responses. *Semin Cell Dev Biol*. 2010; 21(5):479-85.
30. -Eliaison JL, Hannawa KK, Ailawadi G, Sinha I, Ford JW, Deogracias MP, Roelofs KJ, Woodrum DT, Ennis TL, Henke PK, Stanley JC, Thompson RW, Upchurch GR Jr. Neutrophil depletion inhibits experimental abdominal aortic aneurysm formation. *Circulation*. 2005; 112:232–240
31. -Elneihoum AM, Falke P, Hedblad B, Lindgarde F, Ohlsson K. Leukocyte activation in atherosclerosis: correlation with risk factors. *Atherosclerosis*. 1997;131:79–84.
32. -Eng JK, McCormack AL and Yates JRr. An approach to correlate tandem mass spectral data of peptides with amino acid sequences in a protein database. *J Am Soc Mass Spectrom*. 1994; 5: p. 976--989.
33. -Faergeman O. Introduction: Apolipoproteins and guidelines for prevention of cardiovascular disease. *J Intern Med*. 2006; 259(5):434-6.
34. -Fenn JB, Mann M, Meng CK, Wong SF, Whitehouse CM. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science*. 1989; 246(4926): p. 64--71.
35. -Ferguson CD, Clancy P, Bourke B, Walker PJ, Dear A, Buckenham T, Norman P, Golledge J. Association of statin prescription with small abdominal aortic aneurysm progression. *Am Heart J*. 2010; 159:307–13.
36. -Fielding CJ, Fielding PE. Molecular physiology of reverse cholesterol transport. *J Lipid Res*. 1995; 36:211–228.
37. -Folkesson M, Kazi M, Zhu C, Silveira A, Hemdahl AL, Hamsten A, Hedin U, Swedenborg J, Eriksson P. Presence of NGAL/MMP-9 complexes in human abdominal aortic aneurysms. *Thromb Haemost*. 2007; 98:427–33.

38. -Folkesson M, Silveira A, Eriksson P, Swedenborg J. Protease activity in the multi-layered intraluminal thrombus of abdominal aortic aneurysms. *Atherosclerosis*. 2011; 218(2):294-9.
39. -Fontaine V, Jacob M P, Houard X, Rossignol P, Plissonnier D, Angles-Cano E, Michel J B. Involvement of the mural thrombus as a site of protease release and activation in human aortic aneurysms. *Am J Pathol*. 2002; 161:1701–1710.
40. -Fontaine V, Touat Z, Mtairag E M, Vranckx R, Louedec L, Houard X, Andreassian B, Sebbag U, Palombi T, Jacob M P, Meilhac O, Michel J B. Role of leukocyte elastase in preventing cellular recolonization of the mural thrombus. *Am J Pathol*. 2004; 164:2077–2087.
41. -Forester ND, Cruickshank SM, Scott DJ, Carding SR. Functional characterization of T cells in abdominal aortic aneurysms. *Immunology*. 2005; 115:262–270.
42. -Forsdahl SH, Singh K, Solberg S, Jacobsen BK. Risk factors for abdominal aortic aneurysms. A 7-year prospective study: The Tromso Study, 1994-2001. *Circulation*. 2009; 119:2202.
43. -Fox JE. Cytoskeletal proteins and platelet signaling. *Thromb Haemost*. 2001; 86: 198-213.
44. -Galdston M, Levytska V, Liener I E, Twumasi D Y. Degradation of tropoelastin and elastin substrates by human neutrophil elastase, free and bound to α_2 -macroglobulin in serum of the M and Z (Pi) phenotypes for α_1 -antitrypsin. *Am Rev Respir Dis*. 1979; 119:435–441.
45. -Gamble JR, Skinner MP, Berndt MC, Vadas MA. Prevention of activated neutrophil adhesion to endothelium by soluble adhesion protein GMP140. *Science*. 1990; 249:414–417.
46. -Garbis S, Lubec G, Fountoulakis M. Limitations of current proteomics technologies. *J Chromatogr A*. 2005; 1077:1-18.
47. -Garvey SM, Sinden DS, Schoppee Bortz PD, and Wamhoff, B. R. Cyclosporine up-regulates Krüppel-like factor-4 (KLF4) in vascular smooth muscle cells and drives phenotypic modulation in vivo. *J Pharmacol. Exp*. 2010; Ther.333, 34–42.
48. -Gasic AC, McGuire G, Krater S, Farhood AI, Goldstein MA, Smith CW, Entman ML, Taylor AA. Hydrogen peroxide pretreatment of perfused canine vessels induces ICAM-1 and CD18-dependent neutrophil adherence. *Circulation*. 1991; 84:2154 –2166.
49. -Gavrila D, Li WG, McCormick ML, Thomas M, Daugherty A, Cassis LA, Miller FJ Jr, Oberley LW, Dellsperger KC, Weintraub NL. Vitamin E inhibits abdominal aortic aneurysm formation in angiotensin II-infused apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005; 25:1671–1677.
50. -Ge YS, Teng WY, Zhang CD. Protective effect of cyclophilin A against Alzheimer's amyloid beta-peptide (25-35)-induced oxidative stress in PC12 cells. *Chin. Med. J*. 2009; 716–724.

-
51. -Gechtman Z, Belleli A, Lechpammer S, Shaltiel S. The cluster of basic amino acids in vitronectin contributes to its binding of plasminogen activator inhibitor-1: evidence from thrombin, elastase and plasmin cleaved vitronectins and anti-peptide antibodies. *Biochem J*. 1997; 325:339–349.
52. -Giaginis C, Zira A, Katsargyris A, Klonaris C, Theocharis S. Clinical implication of plasma neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) concentrations in patients with advanced carotid atherosclerosis. *Clin Chem Lab Med*. 2010; 48:1035–41.
53. -Gibson TL, Cohen P. Inflammation-related neutrophil proteases, cathepsin G and elastase, function as insulin-like growth factor binding protein proteases. *Growth Horm IGF Res*. 1999; 9:241–53.
54. -Gilman SD, Chapman PJ. Microchip Capillary Electrophoresis. *Methods Mol Biol*. 2006; 339:187–202.
55. -Golledge AL, Walker P, Norman PE, Golledge J. A systematic review of studies examining inflammation associated cytokines in human abdominal aortic aneurysm samples. *Dis Markers*. 2009; 26:181–8.
56. -Golledge J, Clancy P, Jamrozik K, Norman PE. Obesity, adipokines, and abdominal aortic aneurysm - Health in men study. *Circulation*. 2007; 116:2275–9.
57. -Golledge J, Tsao PS, Dalman RL, Norman PE. Circulating markers of abdominal aortic aneurysm presence and progression. *Circulation*. 2008; 118:2382–2392.
58. -Gorg A, Obermaier C, Boguth G, Harder A, Scheibe B, Wildgruber R, Weiss W. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis*. 2000; 21:1037–53.
59. -Gorg A, Postel W, Gunther S. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis*. 1988; 9:531–46.
60. -Gourlay LJ, Angelucci F, Baiocco P, Boumis G, Brunori M, Bellelli A, and Miele AE. The three-dimensional structure of two redox states of cyclophilin A from *Schistosoma mansoni*. Evidence for redox regulation of peptidyl-prolyl cis-trans isomerase activity. *J Biol Chem*. 2007; 282, 24851–24857.
61. -Graham TE, Yang Q, Blüher M, Hammarstedt A, Ciaraldi TP, Henry RR, Wason CJ, Oberbach A, Jansson PA, Smith U, Kahn BB. Retinol-binding protein 4 and insulin resistance in lean, obese, and diabetic subjects. *N Engl J Med*. 2006; 354, 2552–63.
62. -Granger J, Siddiqui J, Copeland S, Remick D. Albumin depletion of human plasma also removes low abundance proteins including the cytokines. *Proteomics*. 2005; 5:4713–8.
63. -Grigoryants V, Hannawa KK, Pearce CG, Sinha I, Roelofs KJ, Ailawadi G, Deatrick KB, Woodrum DT, Cho BS, Henke PK, Stanley JC, Eagleton MJ, Upchurch GR. Tamoxifen up-regulates catalase

production, inhibits vessel wall neutrophil infiltration, and attenuates development of experimental abdominal aortic aneurysms. *J Vasc Surg*. 2005; 41(1):108-14.

64. -Guo ZM, Van Remmen H, Yang H, Chen XL, Mele J, Vijg J, Epstein CJ, Ho YS, Richardson A. Changes in expression of antioxidant enzymes affect cell-mediated LDL oxidation and oxLDL-induced apoptosis in mouse aorta cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2001; 21: 1131–1138.

65. -Gustafsson T, Andersson P, Arnqvist HJ. Different inhibitory actions of IGFBP-1, -2 and -4 on IGF-I effects in vascular smooth muscle cells. *J Endocrinol*. 1999; 161:245–53.

66. -Gygi SP, Corthals GL, Zhang Y, Rochon Y, Aebersold R. Evaluation of two-dimensional gel electrophoresis-based proteome analysis technology. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000; 97:9390-5.

67. -Haase M, Bellomo R, Devarajan P, Schlattmann P, Haase-Fielitz A, NGAL Meta analysis Investigator Group. Accuracy of neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) in diagnosis and prognosis in acute kidney injury: a systematic review and meta-analysis. *Am J Kidney Dis*. 2009; 54:1012–24.

68. -Hanash SM, Pitteri SJ, Faca VM. Mining the plasma proteome for cancer biomarkers. *Nature*. 2008; 452(7187):571-9.

69. -Hannawa KK, Cho BS, Sinha I, Roelofs KJ, Myers DD, Wakefield TJ, Stanley JC, Henke PK, Upchurch GR Jr. Attenuation of experimental aortic aneurysm formation in P-selectin knockout mice. *Ann N Y Acad Sci*. 2006; 1085:353-9.

70. -Hannawa KK, Eliason JL, Woodrum DT, Pearce CG, Roelofs KJ, Grigoryants V, Eagleton MJ, Henke PK, Wakefield TW, Myers DD, Stanley JC, Upchurch GR Jr. L-Selectin-mediated neutrophil recruitment in experimental rodent aneurysm formation. *Circulation*. 2005; 112:241–247.

71. -Hans SS, Jareunpoon O, Balasubramaniam M, Zelenock GB. Size and location of thrombus in intact and ruptured abdominal aortic aneurysms. *J Vasc Surg*. 2005; 41:584–588.

72. -Hassall DG, Owen JS, Bruckdorfer KR. The aggregation of isolated platelets in the presence of lipoproteins and prostacyclin. *Biochem J*. 1983; 216:43–9.

73. -Hellenthal FA, Buurman WA, Wodzig WK, Schurink GW. Biomarkers of abdominal aortic aneurysm progression. Part 2: Inflammation. *Nat Rev Cardiol*. 2009; 6(8):543-52.

74. -Hellenthal FA, Buurman WA, Wodzig WK, Schurink GW. Biomarkers of AAA progression. Part 1: Extracellular matrix degeneration. *Nat Rev Cardiol*. 2009; 6(7):464-74.

75. -Hellenthal FA, Pulinx B, Welten RJ, Teijink JA, van Dieijen-Visser MP, Wodzig WK, Schurink GW. Circulating Biomarkers and Abdominal Aortic Aneurysm Size. *J Surg Res*. 2012; 176(2):672-8

76. -Henderson EL, Gerg YJ, Sukhova GK, Whittemore AD, Knox J, Libby P. Death of smooth muscle cells and expression of mediators of apoptosis by T lymphocytes in human abdominal aortic aneurysms. *Circulation*. 1999; 99: 96–104.
77. -Henzel WJ, Billeci TM, Stults JT, Wong SC, Grimley C, Watanabe C. Identifying proteins from two-dimensional gels by molecular mass searching of peptide fragments in protein sequence databases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993; 90(11): p. 5011–5.
78. -Heo SK, Yi HS, Yun HJ, Ko CH, Choi JW and Park SD. Ethylacetate extract from *Draconis Resina* inhibits LPS-induced inflammatory responses in vascular smooth muscle cells and macrophages via suppression of ROS production. *Food Chem. Toxicol* 2010; 48, 1129–1136.
79. -Hoffman E, Stroobant V. Time of flight analyzers. In: Mass Spectrometry. Principles and applications. 2nd Edn. New York: Wiley, 2003.
80. -Hong F, Lee J, Song JW, Lee SJ, Ahn H, Cho JJ, Ha J, Kim SS. Cyclosporin A blocks muscle differentiation by inducing oxidative stress and inhibiting the peptidyl-prolyl-cis-trans isomerase activity of cyclophilin A: cyclophilin A protects myoblasts from cyclosporin A-induced cytotoxicity. *FASEB J*. 2002; 16, 1633–1635.
81. -Houard X, Rouzet F, Touat Z, Philippe M, Dominguez M, Fontaine V, Sarda-Mantel L, Meulemans A, Le Guludec D, Meilhac O, Michel J. B. Topology of the fibrinolytic system within the mural thrombus of human abdominal aortic aneurysms. *J Pathol*. 2007; 212, 20–28
82. -Houard X, Touat Z, Ollivier V, Louedec L, Philippe M, Sebbag U, Meilhac O, Rossignol P, Michel JB. Mediators of neutrophil recruitment in human abdominal aortic aneurysms. *Cardiovasc Res*. 2009; 82:532–41.
83. -Huang RP. Simultaneous detection of multiple proteins with an array-based enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and enhanced chemiluminescence (ECL). *Clin Chem Lab Med*. 2001; 39(3):209–14.
84. -Hultgren R, Granath F, Swedenborg J. Different disease profiles for women and men with abdominal aortic aneurysms. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2007; 33:556–560.
85. -Ingelsson E, Lind L. Circulating retinol-binding protein 4 and subclinical cardiovascular disease in the elderly. *Diabetes Care* 2009; 32:733–5.
86. -James P, Quadroni M, Carafoli E, Gonnet G. Protein identification by mass profile fingerprinting. *Biochem Biophys Res Commun*, 1993; 195(1): p. 58–64.
87. -Janke J, Engeli S, Boschmann M, Adams F, Böhnke J, Luft FC, Sharma AM, Jordan J. Retinol-binding protein 4 in human obesity. *Diabetes*. 2006; 55:2805–10.

88. -Jin ZG, Melaragno MG, Liao DF, Yan C, Haendeler J, Suh YA, Lambeth JD, Berk BC. Cyclophilin A is a secreted growth factor induced by oxidative stress. *Circ Res.*2000; 87, 789–796.
89. -Juvonen J, Surcel HM, Satta J, Teppo AM, Bloigu A, Syrjälä H, Airaksinen J, Leinonen M, Saikku P, Juvonen T. Elevated circulating levels of inflammatory cytokines in patients with abdominal aortic aneurysm. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997; 17(11):2843-7.
90. -Karas M, Hillenkamp F. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Anal Chem.* 1988; 60(20): p. 2299-301.
91. -Karey KP, Sirbasku DA. Human platelet-derived mitogens, II: subcellular localization of insulin like growth factor I to the alpha-granule and release in response to thrombin. *Blood.* 1989; 74:1093–100.
92. -Kazi M, Thyberg J, Religa P, Roy J, Eriksson P, Hedin U, Swedenborg J. Influence of intraluminal thrombus on structural and cellular composition of abdominal aortic aneurysm wall. *J Vasc Surg.* 2003; 38(6):1283-92.
93. -Kjeldsen L, Cowland JB, Borregaard N. Human neutrophil gelatinase-associated lipocalin and homologous proteins in rat and mouse. *Biochim Biophys Acta.* 2000; 1482:272–83.
94. -Kjeldsen L, Johnsen AH, Sengelov H, Borregaard N. Isolation and primary structure of NGAL, a novel protein associated with human neutrophil gelatinase. *J Biol Chem.* 1993; 268:10425–32.
95. -Kjeldsen L, Sengeløv H, Lollike K, Nielsen MH, Borregaard N. Isolation and characterization of gelatinase granules from human neutrophils. *Blood.* 1994; 83:1640–9.
96. -Kodali R, Hajjou M, Berman AB, Bansal MB, Zhang S, Pan JJ, Schecter AD. Chemokines induce matrix metalloproteinase-2 through activation of epidermal growth factor receptor in arterial smooth muscle cells. *Cardiovasc Res.* 2006; 69:706–15.
97. -Kolkenbrock H, Hecker-Kia A, Orgel D, Ulbrich N, Will H. Activation of progelatinase A and progelatinase A/TIMP-2 complex by membrane type 2-matrix metalloproteinase. *Biol Chem.* 1997; 378:71–6.
98. -Kolodgie FD, Gold HK, Burke AP, Fowler DR, Kruth HS, Weber DK, Farb A, Guerrero LJ, Hayase M, Kutys R, Narula J, Finn AV, Virmani R. Intraplaque hemorrhage and progression of coronary atheroma. *N Engl J Med.* 2003; 349:2316–2325.
99. -Krotz F, Sohn HY, Gloe T, Zahler S, Riexinger T, Schiele TM, Becker BF, Theisen K, Klaus V, Pohl U. NAD(P)H oxidase-dependent platelet superoxide anion release increases platelet recruitment. *Blood.* 2002; 100:917-24.

- 100.** -Kuivaniemi H, Platsoucas CD, Tilson MD. Aortic Aneurysms: An Immune Disease With a Strong Genetic Component. *Circulation*. 2008; 117: 242–252.
- 101.** -Kurvers H, Veith FJ, Lipsitz EC, Ohki T, Gargiulo NJ, Cayne NS, Suggs WD, Timaran CH, Kwon GY, Rhee SJ, Santiago C. Discontinuous, staccato growth of abdominal aortic aneurysms. *J Am Coll Surg*. 2004; 199(5):709-15.
- 102.** -Labruto F, Blomqvist L, and Swedenborg J. Imaging the Intraluminal Thrombus of Abdominal Aortic Aneurysms: Techniques, Findings, and Clinical Implications. *J Vasc Interv Radiol*. 2011; 22:1069–1075.
- 103.** -Lang CH, Nystrom GJ, Frost RA. Tissue-specific regulation of IGF-I and IGF-binding proteins in response to TNF α . *Growth Horm IGF Res*. 2001; 11:250–60.
- 104.** -Leavey PJ, Gonzalez-Aller C, Thurman G, Kleinberg M, Rinckel L, Ambruso DW, Freeman S, Kuypers FA, Ambruso DR. A 29-kDa protein associated with p67phox expresses both peroxiredoxin and phospholipase A2 activity and enhances superoxide anion production by a cell-free system of NADPH oxidase activity. *J Biol Chem*. 2002; 277:45181–45187.
- 105.** -Leclercq A, Houard X, Philippe M, Ollivier V, Sebbag U, Meilhac O, Michel J B. Involvement of intraplaque hemorrhage in atherothrombosis evolution via neutrophil protease enrichment. *J Leukoc Biol*. 2007; 82:1420–14296.
- 106.** – Lee-Rueckert M, Kovanen PT. Extracellular modifications of HDL in vivo and the emerging concept of proteolytic inactivation of pre β -HDL. *Curr Opin Lipidol*. 2011; 22(5):394-402. Review.
- 107.** -Lee TH, Kim SU, Yu SL, Kim SH, Park DS, Moon HB, Dho SH, Kwon KS, Kwon HJ, Han YH, Jeong S, Kang SW, Shin HS, Lee KK, Rhee SG, Yu DY. Peroxiredoxin II is essential for sustaining life span of erythrocytes in mice. *Blood*. 2003 June 15;101(12):5033-8.
- 108.** -Liao DF, Jin ZG, Baas AS, Daum G, Gygi SP, Aebersold R, Berk BC. Purification and identification of secreted oxidative stress-induced factors from vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem*. 2000; 275, 189–196.
- 109.** -Lin Y, Huang R, Chen LP, Lisoukov H, Lu ZH, Li S, Wang CC, Huang RP. Profiling of cytokine expression by biotin-labeled-based protein arrays. *Proteomics*. 2003; 3(9):1750-7.
- 110.** -Lindeman JH, Abdul-Hussien H, van Bockel JH, Wolterbeek R, Kleemann R. Clinical trial of doxycycline for matrix metalloproteinase-9 inhibition in patients with an abdominal aneurysm: doxycycline selectively depletes aortic wall neutrophils and cytotoxic T cells. *Circulation*. 2009; 119:2209 –2216.
- 111.** -Lindholt JS, Ashton HA, Heickendorff L, Scott RA. Serum elastin peptides in the preoperative evaluation of abdominal aortic aneurysms. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2001; 22(6):546-50.

- 112.** -Lindholt JS, Heickendorff L, Antonsen S, Fasting H, Henneberg EW. Natural history of abdominal aortic aneurysm with and without coexisting chronic obstructive pulmonary disease. *J Vasc Surg.* 1998; 28(2):226-33.
- 113.** -Lindholt JS, Jørgensen B, Klitgaard NA, Henneberg EW. Systemic levels of cotinine and elastase, but not pulmonary function, are associated with the progression of small abdominal aortic aneurysms. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2003; 26(4):418-22.
- 114.** -Lindholt JS, Martin-Ventura JL, Urbonavicius S, Ramos-Mozo P, Flyvbjerg A, Egido J, Henneberg EW, Frystyk J. Insulin-like growth factor I - a novel biomarker of abdominal aortic aneurysms. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2011; 42(5):560-2.
- 115.** -Lindholt JS, Sorensen HT, Michel JB, Thomsen HF, Henneberg EW. Low-dose aspirin may prevent growth and later surgical repair of medium-sized abdominal aortic aneurysms. *Vasc. Endovascular Surg.* 2008; 42, 329–334.
- 116.** -Lindholt JS. Activators of Plasminogen and the progression of small abdominal aortic aneurysms. *Ann N Y Acad Sci.* 2006; 1085:139-50.
- 117.** -Liu Y, Yin HJ, Chen KJ. Research on the correlation between platelet gelsolin and blood-stasis syndrome of coronary heart disease. *Chin J Integr Med.* 2011; 17(8):587-92.
- 118.** -López-Candales A, Holmes DR, Liao S, Scott MJ, Wickline SA, Thompson RW. Decreased vascular smooth muscle cell density in medial degeneration of human abdominal aortic aneurysms. *Am. J. Pathol.* 1997; 150, 993–1007.
- 119.** -Loria V, Dato I, Graziani F, Biasucci LM. Myeloperoxidase: a new biomarker of inflammation in ischemic heart disease and acute coronary syndromes. *Mediators Inflamm.* 2008; 135625.
- 120.** -Maiellaro-Rafferty K, Weiss D, Joseph G, Wan W, Gleason RL, Taylor WR. Catalase overexpression in aortic smooth muscle prevents pathological mechanical changes underlying abdominal aortic aneurysm formation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2011; 301:H355–H362.
- 121.** -Májek P, Reicheltová Z, Suttar J, Malý M, Oravec M, Pečánková K, Dyr JE. Plasma proteome changes in cardiovascular disease patients: novel isoforms of apolipoprotein A1. *J Transl Med.* 2011; 1;9:84. Doi: 10.1186/1479-5876-9-84.
- 122.** -Mañes S, Mira E, Barbacid MM, Ciprés A, Fernández-Resa P, Buesa JM, Mérida I, Aracil M, Márquez G, Martínez-A C. Identification of insulin-like growth factor binding protein-1 as a potential physiological substrate for human stromelysin 3. *J Biol Chem.* 1997; 272:25706–12.
- 123.** -Mann M, Hendrickson RC, Pandey A. Analysis of proteins and proteomes by mass spectrometry. *Annu Rev Biochem.* 2001; 70:437-73.

- 124.** -Marcinkiewicz M, Gordon PV. A role for plasmin in platelet aggregation: differential regulation of IGF release from IGF-IGFBP complexes?. *Growth Horm IGF Res.* 2008; 18:325–34.
- 125.** -Marouga R, David S, Hawkins E. The development of the DIGE system: 2D fluorescence difference gel analysis technology. *Anal Bioanal Chem.* 2005; 382:669-78.
- 126.** -Martinez-Pinna R, Lindholt JS, Blanco-Colio LM, Dejouvencel T, Madrigal-Matute J, Ramos-Mozo P, Vega de Ceniga M, Michel JB, Egido J, Meilhac O, Martin-Ventura JL. Increased levels of thioredoxin in patients with abdominal aortic aneurysms (AAA): a potential link of oxidative stress with AAA evolution. *Atherosclerosis.* 2010; 212: 333–338.
- 127.** -Martinez-Pinna R, Ramos-Mozo P, Madrigal-Matute J, Blanco-Colio LM, Lopez JA, Calvo E, Camafeita E, Lindholt JS, Meilhac O, Delbosc S, Michel JB, de Ceniga MV, Egido J, Martin-Ventura JL. Identification of peroxiredoxin-1 as a novel biomarker of abdominal aortic aneurysm. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011; 31(4):935-43.
- 128.** -Martin-Ventura JL, Leclercq A, Blanco-Colio LM, Egido J, Rossignol P, Meilhac O, Michel JB. Low plasma levels of HSP70 in patients with carotid atherosclerosis are associated with increased levels of proteolytic markers of neutrophil activation. *Atherosclerosis.* 2007; 194:334 –341.
- 129.** -Medzihradsky KF, Campbell JM, Baldwin MA, Falick AM, Juhasz P, Vestal ML, Burlingame AL. The characteristics of peptide collision-induced dissociation using a highperformance MALDI-TOF/TOF tandem mass spectrometer. *Anal Chem* 2000; 72:552-8.
- 130.** -Michel JB, Martín-Ventura JL, Egido J, Sakalihasan N, Treska V, Lindholt J, Allaire E, Thorsteinsdottir U, Cockerill G, Swedenborg J; For the FAD EU consortium. Novel aspects of the pathogenesis of aneurysms of the abdominal aorta in humans. *Cardiovasc Res.* 2011; 90:18-27
- 131.** -Michel JB, Virmani R, Arbustini E, Pasterkamp G. Intraplaque haemorrhages as the trigger of plaque vulnerability. *Eur Heart J.* 2011; 32:1977-85, 1985a, 1985b, 1985c.
- 132.** -Miyama N, Dua MM, Yeung JJ, Schultz GM, Asagami T, Sho E, Sho M, Dalman RL. Hyperglycemia limits experimental aortic aneurysm progression. *J Vasc Surg.* 2010; 52:975-83.
- 133.** -Motani AS, Anggård EE, Ferns GA. Recombinant insulin-like growth factor-1 modulates aggregation in human platelets via extracellular calcium. *Life Sci .* 1996; 58:PL269–74.
- 134.** -Mtairag E M, Houard X, Rais S, Pasquier C, Oudghiri M, Jacob M P, Meilhac O, Michel J B. Pharmacological potentiation of natriuretic peptide limits polymorphonuclear neutrophil-vascular cell interactions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002; 22:1824–1831.

- 135.** -Nchimi A, Defawe O, Brisbois D, Broussaud TK, Defraigne JO, Magotteaux P, Massart B, Serfaty JM, Houard X, Michel JB, Sakalihasan N. MR imaging of iron phagocytosis in intraluminal thrombi of abdominal aortic aneurysms in humans. *Radiology*. 2010; 254:973-81.
- 136.** -Nebert DW, Vasiliou VH. Analysis of the glutathione S-transferase (GST) gene family. *Genomics*. 2004; 1(6):460-4.
- 137.** -Nigro P, Satoh K, O'Dell MR, Soe NN, Cui Z, Mohan A, Abe JI, Alexis JD, Sparks JD, Berk BC. Cyclophilin A is an inflammatory mediator that promotes atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *J Exp Med*. 2011; 208, 53–66.
- 138.** -Nishikawa M, Hashida M, Takakura Y. Catalase delivery for inhibiting ROS-mediated tissue injury and tumor metastasis. *Adv Drug Deliv Rev*. 2009; 61:319–326.
- 139.** -Nordon I, Brar R, Hinchliffe R, Cockerill G, Loftus I, Thompson M. The role of proteomic research in vascular disease. *J Vasc Surg*. 2009; 49(6):1602-12.
- 140.** -Norman P, Le M, Pearce C, Jamrozik K. Infrarenal aortic diameter predicts all-cause mortality. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004; 24: 1278-82.
- 141.** -Norman P, Spencer CA, Lawrence-Brown MM, Jamrozik K. C-reactive protein levels and the expansion of screen-detected abdominal aortic aneurysms in men. *Circulation*. 2004; 17; 110(7):862-6.
- 142.** -O'Farrell PH. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem*, 1975; 250(10): p. 4007-21.
- 143.** -Ortiz-Muñoz G, Houard X, Martín-Ventura JL, Ishida BY, Loyau S, Rossignol P, Moreno JA, Kane JP, Chalkley RJ, Burlingame AL, Michel JB, Meilhac O. HDL antielastase activity prevents smooth muscle cell anoikis, a potential new antiatherogenic property. *FASEB J*. 2009; 23(9):3129-39.
- 144.** -Ozsavci D, Yardimeci T, Yanikkaya G, Uras F, Hekim N, Nuri Ulutin O. Apo A-I Binding to Platelets Detected by Flow Cytometry. *Thrombosis Research*. 2001; 103, 117–122.
- 145.** -Pandey A, and Mann M. Proteomics to study genes and genomes. *Nature*, 2000; 405(6788): p. 837-46.
- 146.** -Panek B, Gacko M, Pałka J. Metalloproteinases, insulin-like growth factor-I and its binding proteins in aortic aneurysm. *Int J Exp Pathol*. 2004; 85:159–64.
- 147.** -Patel SR, Hartwig JH, Italiano JE. The biogenesis of platelets from megakaryocyte proplatelets. *J Clin Invest*. 2005; 115: 3348-3354.
- 148.** -Patton WF. A thousand points of light: the application of fluorescence detection technologies to two-dimensional gel electrophoresis and proteomics. *Electrophoresis*. 2000; 21:1123-44.

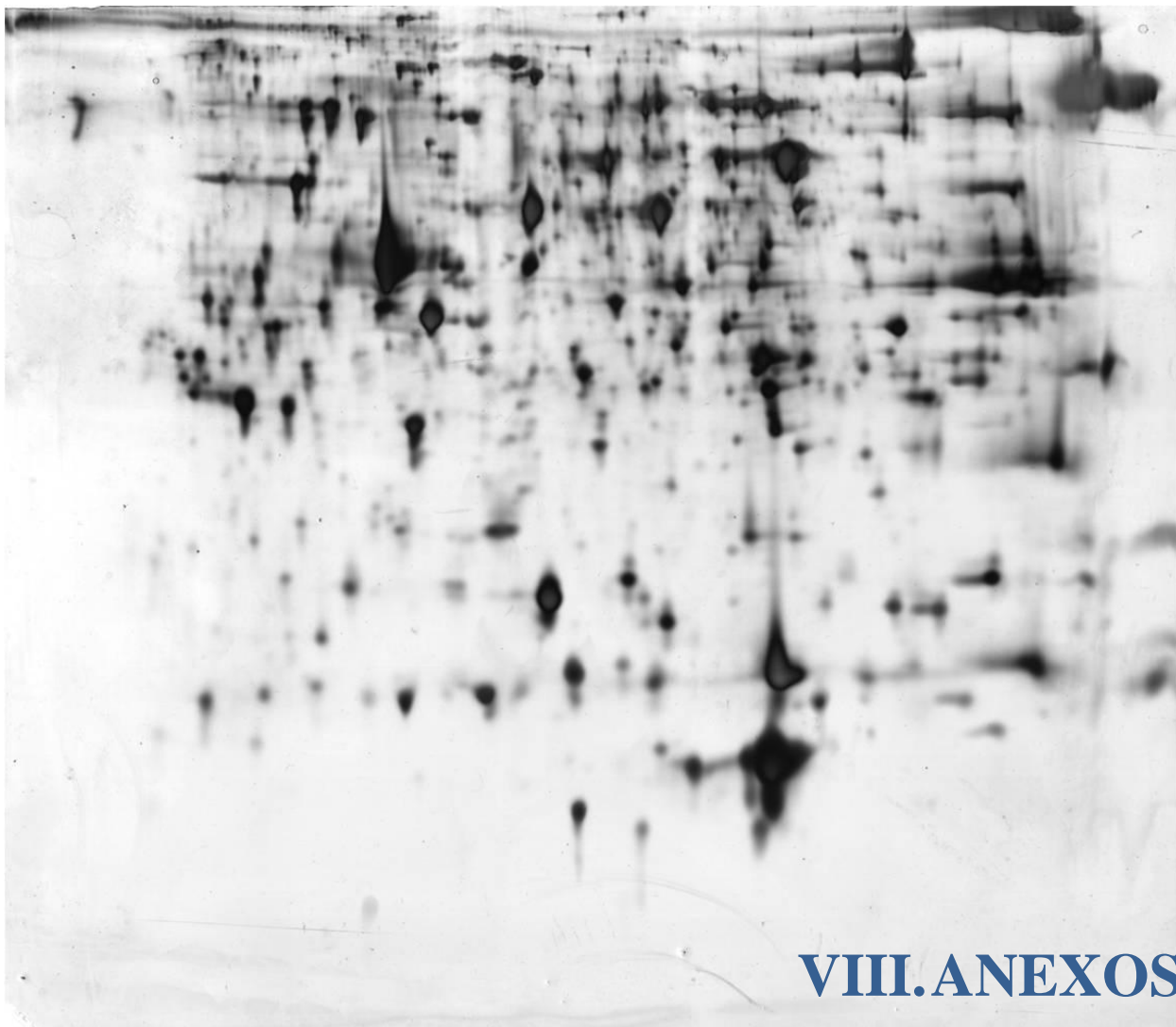
149. -Paulsson J, Dadfar E, Held C, Jacobson SH, Lundahl J. Activation of peripheral and in vivo transmigrated neutrophils in patients with stable coronary artery disease. *Atherosclerosis*. 2007; 192:328–34.
150. -Payeli SK, Schiene-Fischer C, Steffel J, Camici GG, Rozenberg I, Lüscher TF, and Tanner FC. Cyclophilin A differentially activates monocytes and endothelial cells: role of purity, activity, and endotoxin contamination in commercial preparations. *Atherosclerosis*. 2008; 197, 564–571.
151. -Pearce WH, Sweis I, Yao JS, McCarthy WJ, Koch AE. Interleukin-1 beta and tumor necrosis factor- α release in normal and diseased human infrarenal aortas. *J Vasc Surg*. 1992;16(5):784-9.
152. -Perkins DN, Pappin DJ, Creasy DM, Cottrell JS. Probability--based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis*. 1999; 20(18): p. 3551--67.
153. -Powell JT. Mortality results for randomised controlled trial of early elective surgery or ultrasonographic surveillance for small abdominal aortic aneurysms. The UK Small Aneurysm Trial Participants. *Lancet*. 1998; 21; 352(9141):1649-55.
154. -Projahn D, Koenen RR. Platelets: key players in vascular inflammation. *J Leukoc Biol*. 2012; Aug 24.
155. -Rabilloud T. Detecting proteins separated by 2-D gel electrophoresis. *Anal Chem*. 2000; 1;72(1):48A-55A.
156. -Ridker PM, Cannon CP, Morrow D, Rifai N, Rose LM, McCabe CH, Pfeffer MA, Braunwald E. C-reactive protein levels and outcomes after statin therapy. *N Engl J Med*. 2005; 6; 352(1):20-8.
157. -Rizas KD, Ippagunta N, TilsonMDIII. Immune cells and molecular mediators in the pathogenesis of the abdominal aortic aneurysm. *Cardiol Rev*. 2009; 17(5):201-10.
158. -Roepstorff P, Richter WJ. Status of and developments in, mass spectrometry of peptides and proteins. *Int J Mass Spectrom Ion Process*. 1992; 118/119: p. 789--809.
159. -Rohde LE, Arroyo LH, Rifai N, Creager MA, Libby P, Ridker PM, Lee RT. Plasma concentrations of interleukin-6 and abdominal aortic diameter among subjects without aortic dilatation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1999; 19(7):1695-9.
160. -Rouzet F, Bachelet-Violette L, Alsac JM, Suzuki M, Meulemans A, Louedec L, Petiet A, Jandrot-Perrus M, Chaubet F, Michel JB, Le Guludec D, Letourneur D. Radi labeled Fucoidan as a P-Selectin Targeting Agent for In Vivo Imaging of Platelet-Rich Thrombus and Endothelial Activation. *J Nucl Med*. 2011; 52(9):1433-40.
161. -Rowe V L, Stevens SL, Reddick TT, Freeman MB, Donnell R, Carroll R C, Goldman MH. Vascular smooth muscle cell apoptosis in aneurysmal, occlusive, and normal human aortas. *J. Vasc. Surg*. 2000; 31, 567–576.

- 162.** -Sato K, Matoba T, Suzuki J, O'Dell MR, Nigro P, Cui Z, Mohan A, Pan S, Li L, Jin ZG, Yan C, Abe J, Berk BC. Cyclophilin A mediates vascular remodeling by promoting inflammation and vascular smooth muscle cell proliferation. *Circulation*. 2008; 117:3088–3098.
- 163.** -Sato K, Nigro P, Matoba T, O'Dell M R, Cui Z, Shi X, Mohan A, Yan C, Abe JI, Illig K A, Berk BC. Cyclophilin A enhances vascular oxidative stress and the development of angiotensin II-induced aortic aneurysms. *Nat. Med.* 2009; 15, 649–656.
- 164.** -Sato K, Shimokawa H, Berk BC. Cyclophilin A: promising new target in cardiovascular therapy. *Circ J*. 2010; 74(11):2249-56.
- 165.** -Shastri KM, Carvalho AC, Lees RS. Platelet function and platelet lipid composition in the dyslipoproteinemias. *J Lipid Res*. 1980; 21:467–72.
- 166.** -Shevchenko A, Tomas H, Havlis J, Olsen JV, Mann M. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nat Protoc*. 2006; 1, (6), 2856-60.
- 167.** -Shevchenko A, Jensen ON, Podtelejnikov AV, Sagliocco F, Wilm M, Vorm O, Mortensen P, Shevchenko A, Boucherie H, Mann M. Linking genome and proteome by mass spectrometry: large-scale identification of yeast proteins from two dimensional gels. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996; 93(25): p. 14440-5.
- 168.** -Shi MJ, Yang H, Motley ED, Guo ZM. Overexpression of Cu/Zn superoxide dismutase and/or catalase in mice inhibits aorta smooth muscle cell proliferation. *Am J Hypertens*. 2004; 17:450–456.
- 169.** -Simao da Silva E, Rodrigues AJ, Magalhaes Castro de Tolosa E, Rodrigues CJ, Villas Boas do Prado G, Nakamoto JC. Morphology and diameter of infrarenal aortic aneurysms: a prospective autopsy study. *Cardiovasc Surg*. 2000; 8:526–532.
- 170.** -Sinha A, Singh C, Parmar D, Singh MP. Proteomics in clinical interventions: achievements and limitations in biomarker development. *Life Sci*. 2007; 80:1345-54.
- 171.** -Sinha I, Pearce CG, Cho BS, Hannawa KK, Roelofs KJ, Stanley JC, Henke PK, Upchurch GR Jr. Differential regulation of the superoxide dismutase family in experimental aortic aneurysms and rat aortic explants. *J Surg Res*. 2007; 138:156–162.
- 172.** -Soong CV, Blair PH, Halliday MI, McCaigue MD, Campbell GR, Hood JM, Rowlands BJ, Barros D'Sa AA. Endotoxaemia, the generation of the cytokines and their relationship to intramucosal acidosis of the sigmoid colon in elective abdominal aortic aneurysm repair. *Eur J Vasc Surg*. 1993; 7(5):534-9.
- 173.** -Stokes KY, Russell JM, Jennings MH, Alexander JS, Granger DN. Platelet-associated NAD(P)H oxidase contributes to the thrombogenic phenotype induced by hypercholesterolemia. *Free Radic Biol Med*. 2007; 43:22-30.

174. -Stossel TP, Condeelis J, Cooley L, Hartwig JH, Noegel A, Schleicher M, Shapiro S. Filamins as integrators of cell mechanics and signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001; 2: 138-145.
175. -Sureda A, Ferrer MD, Tauler P, Maestre I, Aguiló A, Cordova A, Tur JA, Roche E, Pons A. Intense physical activity enhances neutrophil antioxidant enzyme gene expression. Immunocytochemistry evidence for catalase secretion. *Free Radic Res.* 2007; 41:874–883.
176. -Suvorava T, Kojda G. Reactive oxygen species as cardiovascular mediators: lessons from endothelial-specific protein overexpression mouse models. *Biochim Biophys Acta.* 2009; 1787:802–810.
177. -Swedenborg J, Eriksson P. The intraluminal thrombus as a source of proteolytic activity. *Ann N Y Acad Sci.* 2006; 1085:133-8.
178. -Tanaka K, Itoh K. Reorganization of stress like structures in spreading platelets during surface activation. *J Struct Biol.* 1998; 124: 13-41.
179. -Tang WH, Wu Y, Hartiala J, Fan Y, Stewart AF, Roberts R, McPherson R, Fox PL, Allayee H, Hazen SL. Clinical and genetic association of serum ceruloplasmin with cardiovascular risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012; 32(2):516-22.
180. -Touat Z, Ollivier V, Dai J, Huisse M G, Bezeaud A, Sebbag U, Palombi T, Rossignol P, Meilhac O, Guillin M C, Michel J B. Renewal of mural thrombus releases plasma markers and is involved in aortic abdominal aneurysm evolution. *Am. J. Pathol.* 2006; 168, 1022–1030.
181. -Trouba KJ, Hamadeh HK, Amin RP, Germolec DR. Oxidative stress and its role in skin disease. *Antioxid Redox Signal.* 2002; 4: 665–673.
182. -Uittenbogaard A, Ying Y, Smart EJ. Characterization of a cytosolic heat-shock protein-caveolin chaperone complex. Involvement in cholesterol trafficking. *J Biol Chem.* 1998; 273, 6525–6532.
183. -Urbonavicius S, Lindholt JS, Delbosc S, Urbonaviciene G, Henneberg EW, Vorum H, Meilhac O, Honoré B. Proteins associated with the size and expansion rate of the abdominal aortic aneurysm wall as identified by proteomic analysis. *Interact Cardiovasc Thorac Surg.* 2010; 11(4):433-41.
184. -Urbonavicius S, Urbonaviciene G, Honoré B, Henneberg EW, Vorum H, Lindholt JS. Potential circulating biomarkers for abdominal aortic aneurysm expansion and rupture--a systematic review. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2008;36(3):273-80; discussion 281-2.
185. -Van Dam RM, Hu FB. Lipocalins and insulin resistance: etiological role of retinol-binding protein 4 and lipocalin-2?. *Clin Chem.* 2007; 53(1):5-7.
186. -Van Kuijk JP, Flu WJ, Chonchol M, Bax JJ, Verhagen HJ, Poldermans D. Metabolic syndrome is an independent predictor of cardiovascular events in highrisk patients with occlusive and aneurysmatic peripheral arterial disease. *Atherosclerosis.* 2010; 210:596–601.

- 187.** -Vega de Céniga M, Gómez R, Estallo L, Rodríguez L, Baquer M, Barba A . Growth rate and associated factors in small abdominal aortic aneurysms. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2006; 31:231-6.
- 188.** -Vivanco F, Martín-Ventura JL, Duran MC, Barderas MG, Blanco-Colio L, Dardé VM, Mas S, Meilhac O, Michel JB, Tuñón J, Egido J. Quest for novel cardiovascular biomarkers by proteomic analysis. *J Proteome Res.* 2005; 4:1181-91.
- 189.** -Von Eynatten M, Humpert PM. Retinol-binding protein-4 in experimental and clinical metabolic disease. *Expert Rev Mol Diagn.* 2008; 8:289–99.
- 190.** -Wassef M, Baxter BT, Chisholm RL, Dalman RL, Fillinger MF, Heinecke J, Humphrey JD, Kuivaniemi H, Parks WC, Pearce WH, Platsoucas CD, Sukhova GK, Thompson RW, Tilson MD, Zarins CK. Pathogenesis of abdominal aortic aneurysms: a multidisciplinary research program supported by the National Heart, Lung, and Blood Institute. *J Vasc Surg.* 2001; 34(4):730-8.
- 191.** -Wassink AM, van der Graaf Y, Olijhoek JK, Visseren FL, Group SS. Metabolic syndrome and the risk of new vascular events and all-cause mortality in patients with coronary artery disease, cerebrovascular disease, peripheral arterial disease or abdominal aortic aneurysm. *Eur Heart J.* 2008; 9:213-23.
- 192.** -Weiss W, Görg A. High-resolution two-dimensional electrophoresis. *Methods Mol Biol.* 2009; 564:13-32.
- 193.** -Wheatcroft SB, Kearney MT. IGF-dependent and IGF-independent actions of IGF-binding protein-1 and -2: implications for metabolic homeostasis. *Trends Endocrinol Metab.* 2009; 20:153–62.
- 194.** -Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care.* 2004; 27:1047–53.
- 195.** -Wilkins MR, Pasquali C, Appel RD, Ou K, Golaz O, Sanchez JC, Yan JX, Gooley AA, Hughes G, Humphery-Smith I, Williams KL, Hochstrasser DF. From Proteins to Proteomes: Large Scale Protein Identification by Two-Dimensional Electrophoresis and Amino Acid Analysis. *Biotechnology (N Y).* 1996; 14(1):61-5.
- 196.** -Wilson WR, Herbert KE, Mistry Y, Stevens SE, Patel HR, Hastings RA, Thompson MM, Williams B. Blood leucocyte telomere DNA content predicts vascular telomere DNA content in humans with and without vascular disease. *Eur Heart J.* 2008; 29: 2689–2694.
- 197.** -Wolf YG, Thomas WS, Brennan FJ, Goff WG, Sise MJ, Bernstein EF. Computed tomography scanning findings associated with rapid expansion of abdominal aortic aneurysms. *J. Vasc. Surg.* 1994; 20: 529–535; Discussion 535–538.

- 198.** -Xiong W, Mactaggart J, Knispel R, Worth J, Zhu Z, Li Y, Sun Y, Baxter BT, Johanning J. Inhibition of reactive oxygen species attenuates aneurysm formation in a murine model. *Atherosclerosis*. 2009; 202:128–134.
- 199.** -Yang Y, Lu N, Zhou J, Chen ZN, Zhu P. Cyclophilin A up-regulates MMP-9 expression and adhesion of monocytes/macrophages via CD147 signalling pathway in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)*. 2008; 47, 1299–1310.
- 200.** -Yang Q, Graham TE, Mody N, Preitner F, Peroni OD, Zabolotny JM, Kotani K, Quadro L, Kahn BB. Serum retinol binding protein 4 contributes to insulin resistance I in obesity and type 2 diabetes. *Nature*. 2005; Vol 436.
- 201.** -Yao Q, Li M, Yang H, Chai H, Fisher W, Chen C. Roles of cyclophilins in cancers and other organ systems. *World J Surg*. 2005; 29, 276–280.
- 202.** -Yeap BB, Chubb SA, McCaul KA, Flicker L, Ho KK, Golledge J, Hankey GJ, Norman PE. Associations of IGF1 and its binding proteins with abdominal aortic aneurysm and aortic diameter in older men. *Eur J Endocrinol*. 2012; 166(2):191-7.
- 203.** -Yndestad A, Landrø L, Ueland T, Dahl CP, Flo TH, Vinge LE, Espevik T, Frøland SS, Husberg C, Christensen G, Dickstein K, Kjekshus J, Øie E, Gullestad L, Aukrust P. Increased systemic and myocardial expression of neutrophil gelatinase-associated lipocalin in clinical and experimental heart failure. *Eur Heart J*. 2009; 30:1229–36.
- 204.** -Yokoyama S, Ikeda H, Haramaki N, Yasukawa H, Murohara T, Imaizumi T. Platelet P-selectin plays an important role in arterial thrombogenesis by forming large stable platelet-leukocyte aggregates. *J Am Coll Cardiol*. 2005; 45:1280–1286.
- 205.** -Zhang R, Brennan ML, Fu X, Aviles RJ, Pearce GL, Penn MS, Topol EJ, Sprecher DL, Hazen SL. Association between myeloperoxidase levels and risk of coronary artery disease. *JAMA*. 2001;286:2136 – 2142.
- 206.** -Zhu C, Wang X, Deinum J, Huang Z, Gao J, Modjtahedi N, Neagu MR, Nilsson M, Eriksson PS, Hagberg H, Luban J, Kroemer G, and Blomgren K. Cyclophilin A participates in the nuclear translocation of apoptosis-inducing factor in neurons after cerebral hypoxia-ischemia., *J. Exp. Med*. 2007; 204, 1741–1748.
- 207.** -Zografos T, Haliassos A, Korovesis S, Giazitzoglou E, Voriadis E, Katritsis D. Association of neutrophil gelatinase-associated lipocalin with the severity of coronary artery disease. *Am J Cardiol*. 2009; 104:917–20.



Anexos

El trabajo realizado durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral dio lugar a las siguientes publicaciones en revistas internacionales con índice de impacto:

1-. Erythrocytes, leukocytes and platelets as a source of oxidative stress in chronic vascular diseases: Detoxifying mechanisms and potential therapeutic options.

Martin-Ventura JL, Madrigal-Matute J, Martinez-Pinna R, **Ramos-Mozo P**, Blanco-Colio LM, Moreno JA, Tarin C, Burillo E, Fernandez-Garcia CE, Egido J, Meilhac O, Michel JB. *Thromb Haemost.* 2012 Sep 4;108(3):435-42. Epub 2012 Jul 26.

2-. Cell stress proteins in atherothrombosis.

Madrigal-Matute J, Martinez-Pinna R, Fernandez-Garcia CE, **Ramos-Mozo P**, Burillo E, Egido J, Blanco-Colio LM, Martin-Ventura JL. *Oxid Med Cell Longev.* 2012; 232464. Epub 2012 Jun 25.

3-. Metabolomic study of plasma of patients with abdominal aortic aneurysm.

Rupérez FJ, **Ramos-Mozo P**, Teul J, Martinez-Pinna R, Garcia A, Malet-Martino M, Camafeita E, Lopez JA, Pastor-Vargas C, Egido J, Balayssac S, Gilard V, Barbas C, Martin-Ventura JL. *Anal Bioanal Chem.* 2012 Jun; 403(6):1651-60. Epub 2012 Apr 29.

4-. Plasma profiling by a protein array approach identifies IGFBP-1 as a novel biomarker of abdominal aortic aneurysm.

Ramos-Mozo P, Rodriguez C, Pastor-Vargas C, Blanco-Colio LM, Martinez-Gonzalez J, Meilhac O, Michel JB, Vega de Ceniga M, Egido J, Martin-Ventura JL. *Atherosclerosis.* 2012 Apr;221(2):544-50. Epub 2012 Jan 25.

5-. Increased plasma levels of NGAL, a marker of neutrophil activation, in patients with abdominal aortic aneurysm.

Ramos-Mozo P, Madrigal-Matute J, Vega de Ceniga M, Blanco-Colio LM, Meilhac O, Feldman L, Michel JB, Clancy P, Golledge J, Norman PE, Egido J, Martin-Ventura JL. *Atherosclerosis.* 2012 Feb; 220(2):552-6. Epub 2011 Nov 25.

6-. Proteomic analysis of polymorphonuclear neutrophils identifies catalase as a novel biomarker of abdominal aortic aneurysm: potential implication of oxidative stress in abdominal aortic aneurysm progression.

Ramos-Mozo P, Madrigal-Matute J, Martinez-Pinna R, Blanco-Colio LM, Lopez JA, Camafeita E, Meilhac O, Michel JB, Aparicio C, Vega de Ceniga M, Egido J, Martín-Ventura JL. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2011 Dec;31(12):3011-9. Epub 2011 Sep 22.

7-. Insulin-like growth factor I - a novel biomarker of abdominal aortic aneurysms.

Lindholt JS, Martin-Ventura JL, Urbonavicius S, **Ramos-Mozo P**, Flyvbjerg A, Egido J, Henneberg EW, Frystyk J. Eur J Vasc Endovasc Surg. 2011 Nov;42(5):560-2. Epub 2011 Aug 17.

8-. Identification of peroxiredoxin-1 as a novel biomarker of abdominal aortic aneurysm.

Martinez-Pinna R, **Ramos-Mozo P**, Madrigal-Matute J, Blanco-Colio LM, Lopez JA, Calvo E, Camafeita E, Lindholt JS, Meilhac O, Delbosc S, Michel JB, Vega de Ceniga M, Egido J, Martin-Ventura JL. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2011 Apr;31(4):935-43. Epub 2011 Jan 27.

9-. Increased levels of thioredoxin in patients with abdominal aortic aneurysms (AAAs). A potential link of oxidative stress with AAA evolution.

Martinez-Pinna R, Lindholt JS, Blanco-Colio LM, Dejouvencel T, Madrigal-Matute J, **Ramos-Mozo P**, Vega de Ceniga M, Michel JB, Egido J, Meilhac O, Martin-Ventura JL. Atherosclerosis. 2010 Sep;212(1):333-8. Epub 2010 Jun 1.

10-. Proteomic and metabolomic profiles in atherothrombotic vascular disease.

Martinez-Pinna R, Barbas C, Blanco-Colio LM, Tunon J, **Ramos-Mozo P**, Lopez JA, Meilhac O, Michel JB, Egido J, Martin-Ventura JL. Curr Atheroscler Rep. 2010 May;12(3):202-8. Review.

11-. Heat shock protein 90 inhibitors attenuate inflammatory responses in atherosclerosis.

Madrigal-Matute J, López-Franco O, Blanco-Colio LM, Muñoz-García B, **Ramos-Mozo P**, Ortega L, Egido J, Martín-Ventura JL. Cardiovasc Res. 2010 May 1;86(2):330-7. Epub 2010 Feb 12.

ARTÍCULOS EN REVISIÓN:***ROLE OF EXTRACELLULAR CYCLOPHILIN A IN HUMAN ABDOMINAL AORTIC ANEURYSM.***

Tarín Carlos, PhD, Ramos-Mozo Priscila, BSc, Madrigal-Matute Julio, BsC, Blanco-Colio Lus Miguel, PhD, Meilhac Olivier, PhD, Michel Jean-Baptiste, MD, PhD; Egido Jesús, MD, PhD, Martín-Ventura José Luis, PhD.